

Chemische Synthese des Polyacetylen-Naturstoffes Callysponginsäure und neuartiger, Phosphonat- basierter aktivitätsbasierter Sonden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Sabrina Nickel

aus Datteln
Oktober 2012

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Open-Minded

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Zeit von November 2007 bis Juni 2011 am Chemical Genomics Centre des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund und in der Zeit von Juni 2011 bis Oktober 2012 am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung Chemische Biologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1.Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser

2.Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader

3.Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Michael Ehrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2013

Meiner Familie

Teile dieser Dissertation sind in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Mining the active Proteome of *Arabidopsis thaliana*; R.A. van der Hoorn, T. Colby, S. Nickel, K.H. Richau, J. Schmidt, M. Kaiser, *Front. Plant Sci.* **(2011)** 2, 89.

A para-nitrophenol phosphonate probe labels distinct serine hydrolases of *Arabidopsis*; S. Nickel, F. Kaschani, T. Colby, R.A.L van der Hoorn, M. Kaiser, *Bioorg. Med. Chem.* **(2012)** 20, 601.

Selective inhibition of plant serine hydrolases by agrochemicals revealed by competitive ABPP; F. Kaschani, S. Nickel, B. Pandey, B.F. Cravatt, M. Kaiser, R.A. van der Hoorn, *Bioorg. Med. Chem.* **(2012)** 20, 597.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	14
Abbildungsverzeichnis.....	19
1. Einleitung.....	25
1.1 Chemische Proteomik	25
1.1.1 Einführung.....	25
1.1.2 Aktivitäts-basiertes Protein Profiling (ABPP).....	29
1.1.2.1 Einführung	29
1.1.2.2 Die Elemente einer ABP: die reaktive Gruppe	30
1.1.2.3 Die Elemente einer ABP: Der Reporter.....	33
1.1.2.4 Die Elemente einer ABP: Der Linker.....	34
1.1.2.5 Die Durchführung von ABPP-Experimenten	35
1.1.2.6 2-Stufen-ABPP	36
1.1.2.7 Analyseplattformen	37
1.1.2.8 Komparatives vs. Kompetitives ABPP	39
1.1.2.9 Beispiele für Enzymklassenspezifische ABP-Sonden.....	41
1.3 Serinhyrolasen	44
1.3.1. Einführung in die Klasse der Serinhydrolasen	44
1.3.2 Carboxylesterasen – eine biologisch-relevante Unterfamilie der Serinhydrolasen	48
1.4 <i>Archaea</i> -Bakterien.....	51
1.5 Naturstoffe als Ausgangsstrukturen zur Entwicklung von Chemotherapeutika und chemischen Sonden	53
2. Zielsetzung der Arbeit.....	56
3. Ergebnisse und Diskussion	60
3.1 Entwicklung einer Sonde auf der Basis von Callysponginsäure (1).....	60
3.1.1 Retrosynthese zur Darstellung von Callysponginsäure (1)	60

3.1.2 Synthese des 1. Bausteins (linkes Fragment).....	62
3.1.2.1 Monobromierung des Ausgangsmaterials 1,5-Pentandiol (9) und Schützen der verbleibenden Alkoholfunktion	62
3.1.2.2 Umsetzung von Intermediat 13 mit 4-Pentin-1-ol (17).....	64
3.1.2.3 Bromierung von 14	65
3.1.2.4 Kupplung von Intermediat 8 mit 1,6-Heptadiin (18).....	65
3.1.2.5 Entfernung der THP-Schutzgruppe.....	67
3.1.2.6 Modifizierung der freien Alkoholfunktion von 25	67
3.1.3 Synthese des 2. Bausteins.....	72
3.1.3.1 Umlagerung von 3-Octin-1-ol (11)	72
3.1.3.2 Oxidation und anschließende Wittigreaktion	73
3.1.3.3 Reduktion zum Alkohol 40	74
3.1.3.4 Oxidation und anschließende Alkinylierungsreaktion mit Einführung des Stereozenentrums	74
3.1.3.5 Einführung eines Broms an der terminalen Dreifachbindung.....	75
3.1.3.6 Vervollständigung des 2. Bausteins mit der bromierten Dreifachbindung	76
3.1.3.7 Synthese von Iodalkinderivaten zur Durchführung der Cadiot- Chodkiewicz Reaktion	77
3.1.3.8 Oxidation und anschließende Wittigreaktion mit dem Iodalkin 32	77
3.1.3.9 Reduktion des Methylesters 33 zum Alkohol 34	78
3.1.3.10 Oxidation und anschließende Alkynilierung zum 2. Baustein.....	78
3.1.4 Kupplung beider Bausteine	80
3.1.5 Biologische Untersuchungen der Callysponginsäure (1).....	88
3.2 Entwicklung Phosphonat-basierender Aktivitätsbasierter Sonden.....	90
3.2.1. Synthese einer PEG-Fluorophosphonatsonde als Vergleichssonde in ABPP	90
3.2.1.1 Syntheseüberblick Fluorophosphonatsonde 2	90
3.2.1.2 Beschreibung der einzelnen Stufen	91

3.2.1.2.1 Einführung der TBDMS-Schutzgruppe	91
3.2.1.2.2 Überführung einer Hydroxylgruppe von 59 in eine Iodidabgangsgruppe	91
3.2.1.2.3 Phosphorylierung von 61	92
3.2.1.2.4 Entfernen der TBDMS-Schutzgruppe	92
3.2.1.2.5 Einführung einer Acyl-hydroxysuccinimid-Gruppe	93
3.2.1.2.6 Fluorierung des Hydroxysuccinimid-Phosphorsäurederivates 66 ..	94
3.2.1.2.7 Einführung einer Dreifachbindung auf Stufe des Phosphorsäurederivates 66	95
3.2.1.2.8 Einführung einer Dreifachbindung auf Stufe des Phosphonates 63	95
3.2.1.2.9 Synthese des FP-PEG-Derivates 2 vom Phosphonat 64	96
3.2.2 Nitrophenolphosphonate	97
3.2.3 Diversifizierung der <i>p</i> -Nitrophenolphosphonat-Sonden: Austausch der Ethoxygruppe durch eine längere Alkoxygruppe (C ₇)	98
3.2.4 Darstellung von Nitrophenolphosphonat-basierten Sonden mit unterschiedlichen Seitenketten am Phosphor	100
3.2.5 Darstellung Biotin-funktionalisierter und trifunktionaler Phosphonatsonden	104
3.2.8 Evaluierung der Einsatzmöglichkeiten der Phosphonatsonde 4	112
3.2.9 Biologische Experimente zur Phosphonatsondenbibliothek	115
4. Zusammenfassung	118
5. Experimenteller Teil	119
5.1 Generelle Methoden und Instrumente	119
5.2 Synthese des Naturstoffes Callysponginsäure (1)	120
5.2.1 Generelle Methoden	120
5.2.1.1 Generelle Methode A: Kupplungsreaktion mit <i>n</i> -BuLi	120
5.2.1.2 Generelle Methode B: Bromierung mit NBS	120
5.2.1.3 Generelle Methode C: Tosylierung eines Alkohols	120

5.2.1.4 Generelle Methode D: Jonesoxidation	121
5.2.1.5 Generelle Methode E: Oxidation mit Dess-Amrtin-Periodinan	121
5.2.1.6 Generelle Methode F: Wittigreaktion	121
5.2.1.7 Generelle Methode G: Reduktion mit DIBAL-H.....	121
5.2.1.8 Generelle Methode H: Reduktion mit MnO ₂	122
5.2.1.9 Generelle Methode I: Alkynilierungsreaktion.....	122
5.2.1.10 Generelle Methode J: C-H-Bromierung der Dreifachbindung	123
5.2.1.11 Generelle Methode K: C-H-Iodierung der Dreifachbindung	123
5.2.1.12 Generelle Methode L: Cadiot-Chodkiewicz-Reaktion unter Verwendung von Pyrrolidin	123
5.2.1.13 Generelle Methode M: Cadiot-Chodkiewicz-Reaktion	124
5.2.2 Synthese des 1. Bausteins.....	124
5.2.2.1 Synthese von 5-((Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)pentan-1-ol (20)	124
5.2.2.2 Synthese von 2-((5-Brompentyl)oxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran (13)	124
5.2.2.3 Synthese von 5-Brompentan-1-ol (12).....	125
5.2.2.4 Synthese von 2-((5-Brompentyl)oxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran (13)	125
5.2.2.5 Synthese von <i>tert</i> -Butyldimethyl(pent-4-in-1-yloxy)silan (21).....	126
5.2.2.6 Synthese von <i>tert</i> -Butyldimethyl((10-((tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)dec-4-in-1-yl)oxy)silan (22).....	126
5.2.2.7 Synthese von 10-((Tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)dec-4-in-1-ol (14)	127
5.2.2.8 Synthese von 2-((10-Bromdec-6-in-1-yl)oxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran (8)	127
5.2.2.9 Synthese von Hepta-1,6-diin-1-yltrimethylsilan (23)	128
5.2.2.10 Synthese von Trimethyl(17-((tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)heptadeca-1,6,11-triin-1-yl)silan (24).....	128
5.2.2.11 Synthese von 2-(Heptadeca-6,11,16-triin-1-yloxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran (7)	129
5.2.2.12 Synthese von Heptadeca-6,11,16-triin-1-ol (25)	130
5.2.2.13 Synthese von Heptadeca-6,11,16-triin-1-yl-4-methylbenzenesulfonat (26)	130

5.2.2.14 Synthese von Icosa-2,9,14,19-tetrainsäure (5)	130
5.2.2.15 Synthese von <i>tert</i> -Butyl-icosa-2,9,14,19-tetrainoat (29).....	131
5.2.2.16 Synthese von 17-Bromheptadeca-1,6,11-triin (15)	131
5.2.2.17 Synthese von 17-Iodoheptadeca-1,6,11-triin (30).....	132
5.2.2.18 Synthese von 17-Bromheptadeca-1,6,11-triin (15)	132
5.2.2.19 Synthese von Icosa-2,9,14,19-tetrain-1-ol (16).....	133
5.2.2.20 Synthese von Icosa-2,9,14,19-tetrainsäure (5)	133
5.2.3 Synthese des 2. Bausteins.....	134
5.2.3.1 Synthese von 7-Octin-1-ol (31)	134
5.2.3.2 Synthese von Oct-7-inal (38)	134
5.2.3.3 Synthese von Oct-7-inal (38)	135
5.2.3.4 Synthese von Methyl-dec-2-en-9-inoat (39).....	135
5.2.3.5 Synthese von Dec-2-en-9-in-1-ol (40).....	136
5.2.3.6 Synthese von Dec-2-en-9-inal (41)	136
5.2.3.7 Synthese von (S)-1-(Trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-ol (42) .	137
5.2.3.8 Synthese von 5-Brompent-4-in-1-ol (43).....	137
5.2.3.9 Synthese von 10-Bromdec-2-en-9-in-1-ol (44).....	137
5.2.3.10 Synthese von Methyl-10-bromodec-2-en-9-inoat (45).....	138
5.2.3.11 Synthese von 10-Bromdec-2-en-9-in-1-ol (44).....	138
5.2.3.12 Synthese von (S)-12-Brom-1-(trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-ol (46)	138
5.2.3.13 Synthese von 5-Iodpent-4-in-1-ol (47)	139
5.2.3.14 Synthese von 8-Iodoct-7-in-1-ol (32).....	139
5.2.3.15 Synthese von 8-Iodoct-7-inal (10)	140
5.2.3.16 Synthese von 10-Ioddec-2-en-9-inoat (33)	140
5.2.3.17 Synthese von 10-Ioddec-2-en-9-in-1-ol (34)	140
5.2.3.18 Synthese von 10-Ioddec-2-en-9-inal (35).....	141

5.2.3.19 Synthese von (S)-12-Iodo-1-(trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-ol (6)	141
5.2.4 Kupplung beider Bausteine	142
5.2.4.1 Synthese von 7-(Trimethylsilyl)hepta-4,6-diin-1-ol (48).....	142
5.2.4.2 Synthese von Hepta-4,6-diin-1-ol (49)	142
5.2.4.3 Synthese von (S)-29-(Trimethylsilyl)nonacosa-25-en-6,11,16,18,28-pentain-1,27-diol (51).....	143
5.2.4.4 Synthese von (S)-27-Hydroxy-29-(trimethylsilyl)nonacosa-25-en-6,11,16,18,28-pentain-1-yl 4-methylbenzensulfonat (53).....	143
5.2.4.5 Synthese von (S)-27-Hydroxy-29-(trimethylsilyl)nonacosa-25-en-6,11,16,18,28-pentain-1-yl 4-methylbenzensulfonat (53).....	144
5.2.4.6 Synthese von (S)-tert-Butyl((12-iodo-1-(trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-yl)oxy)dimethylsilan (55)	144
5.2.4.7 Synthese von (S)-30-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-32-(trimethylsilyl)dotriaconta-28-en-2,9,14,19,21,31-hexain-1-ol (56).....	145
5.2.4.8 Synthese von (S)-30-Hydroxy-32-(trimethylsilyl)dotriaconta-28-en-2,9,14,19,21,31-hexainsäure (54).....	145
5.2.4.9 Synthese von (S)-30-Hydroxydotriaconta-28-en-2,9,14,19,21,31-hexainsäure (1).....	146
5.3 Synthese der Phosphonatsonden	147
5.3.1 Generelle Methoden.....	147
5.3.1.1 Generelle Methode A: Hydrolyse des Phosphonates zur freien Säure	147
5.3.1.2 Generelle Methode B: Fluorierung mit DAST	147
5.3.1.3 Generelle Methode C: Amid-Kupplung über Hydroxysuccinimid-aktivierte Säuren.....	147
5.3.1.4 Generelle Methode D: Chlorierung am Phosphor	147
5.3.1.5 Generelle Methode E: Darstellung eines Phosphonates aus einem Chlorphosphonat	148
5.3.1.6 Generelle Methode F: Click-Reaktion	148
5.3.2 Synthese von 2,2,3,3-Tetramethyl-4,7,10-13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-ol (59).....	148

5.3.3 Synthese von 15-Iodo-2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan (60)	149
5.3.4 Synthese von Diethyl-(2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-yl)-phosphonat (61)	149
5.3.5 Synthese von Diethyl(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)phosphonat (62)	150
5.3.6 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (63)	150
5.3.7 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxy(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat (66)	151
5.3.8 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxyfluorophosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat (67)	151
5.3.9 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxy(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (65)	152
5.3.10 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl prop-2-in-1-ylcarbamat (64)	152
5.3.11 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxy(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (65)	153
5.3.12 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxyfluorophosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (2)	153
5.3.13 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Chloro)ethoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (68)	154
5.3.14 Synthese von 2-(2-(2-(2-(ethoxy(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (3)	154
5.3.15 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxy(heptyloxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (69)	155

5.3.16 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Chloro(heptyloxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (70)	155
5.3.17 Synthese von 2-(2-(2-(2-((Heptyloxy)(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (71)	156
5.3.18 Synthese von 2-(2-(2-(2-((Heptyloxy)(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (72)	156
5.3.19 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Fluoro(heptyloxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (73)	157
5.3.20 Synthese von 2-(2-(2-(2-(((5-((<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino)pentyl)oxy)(ethoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (74)	158
5.3.21 Synthese von 2-(2-(2-(2-(((5-((<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino)pentyl)oxy)chlorophosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (75)	158
5.3.22 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Chloro(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (77)	159
5.3.23 Synthese von 2-(2-(2-(2-(((3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)propoxy)(ethoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (78)	159
5.3.24 Synthese von 2-(2-(2-(2-(((3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)propoxy)(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (79)	160
5.3.25 Synthese von ((Ethoxy(13-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-14-azaheptadec-16-in-1-yl)phosphoryl)oxy)methyl-pivalat (80)	160
5.3.26 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Hydroxy(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (81)	161
5.3.27 Synthese des Biotin-NHS-Esters (83)	161
5.3.28 Synthese von Biotinpentanamin (84)	162
5.3.29 Synthese von FP-Biotin (85)	162

5.3.30 Synthese von 5-((<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino)pentyl-4-methylbenzensulfonat (89).....	163
5.3.31 Synthese von <i>tert</i> -Butyl (5-azidopentyl)carbamate (90)	163
5.3.32 Synthese von 5-Azidopentan-1-aminiumchlorid (91).....	164
5.3.33 Synthese von Rhodamin-Azid (93).....	164
5.3.34 Synthese von Biotin-Azid (94).....	165
5.3.35 Synthese von 4-((5-Azidopentyl)amino)-4-oxobuttersäure (95)	166
5.3.36 Synthese von Tri-Azid (96).....	166
5.3.41 Synthese von Tri-NP (4).....	167
5.3.42 Synthese von Tri-NP-C7 (97).....	168
5.3.43 Synthese von Rhodamin-NP (98).....	168
5.4 Biologische Experimente	169
5.4.1 Inkubation der Zellkultur.....	169
5.4.2 Reaktionsdetails für den Naturstoff Callysponginsäure (1)	169
5.4.3 Reaktionsdetails zum Experiment mit den Phosphonatsonden	169
Literatur	171
Danksagung	182
Lebenslauf Sabrina Nickel.....	183

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1D	Eindimensional
¹ H-NMR	Protonen-NMR
¹³ C-NMR	Kohlenstoff-NMR
¹⁹ F-NMR	Fluor-NMR
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
³¹ P-NMR	Phosphor-NMR
5'-FSBA	5'-Fluorosulfonylbenzoyladenosen
α _D	Drehwert
ABP	aktivitätsbasierte Sonde (activity-based probe)
ABPP	aktivitätsbasiertes Protein Profiling (activity-based protein profiling)
AcN	Acetonitril
AeCXE	Carboxylesterase in <i>Actinidia eriantha</i>
AFBP	affinitätsalkylierende Sonde (affinity-based probe)
Asp	Asparaginsäure
ASPP	Peptidprofiling aufgrund der Aktivitätsstellen (active-site peptide profiling)
AtCXE	Carboxylesterase in <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bsp.	Beispiel
c	Konzentration
CCCP	Verbindungs-zentrierte chemische Proteomik (compound-centered chemical proteomics)
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CD ₃ OH	deutertes Methanol
cH	Cyclohexan
CXE	Carboxylesterase
CXE7	Carboxylesterase 7
CXE12	Carboxylesterase 12
Cy3	Cyanin 3 Farbstoff

d	Tag, Dublett
DAST	Diethylaminosulfurtrifluorid
dd	Dublett von Dublett
ddd	Dublett von Dublett von Dublett
ddt	Dublett von Dublett von Triplett
dt	Dublett von Triplett
dtd	Dublett von Triplett von Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DCU	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylharnstoff (<i>N,N'</i> -dicyclohexylurea)
DEE	Diethylether
DFPP	4-Difluoromethylphenylphosphat
DIEA	Diisopropylethylamin
DHP	3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMPU	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1 <i>H</i>)-pyrimidinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D ₂ O	deutertes Wasser
DSC	<i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat
EA	Ethylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronensprayionisierung
et al.	et alii (lateinisch: und andere)
EtOH	Ethanol
eq.	Äquivalente
FAAH	Fettsäureamidhydrolase (fatty acid amide hydrolase)
FP	Fluorophosphonat
FP-Rh	Rhodamin-Fluorophosphonat
g	Gramm
G	Glycin

GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HATU	(2-(7-Aza-1 <i>H</i> -benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)
His	Histidin
HMPA	Hexamethylphosphoramid
HPLC	High pressure liquid chromatographie
HTS	High-Throughput-Screen
Hz	Herz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAT	isotopenmarkierten Affinitätsmethode (isotope-coded affinity tag)
J	Kopplungskonstante
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (Liquidchromatographie coupled with mass spectrometry)
LHMDS	Lithium-(bistrimethylsilyl)amid
m	Multiplett
M	Molar
MAGL	Monoacylglycerollipase
mbar	Millibar
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Mililiter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
mSH	Serinhydrolasen, die mit Metaboliten reagieren
MudPIT	multidimensionalen Proteinidentifikationsmethode (multidimensional protein identification technology)
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid

nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
OH	Hydroxy
<i>p</i>	para
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
Pd	Palladium
PEG	Polyethylenglykol
POPL	Prlyl oligopeptidase-ähnliche
ppm	parts per million
PPTS	Pyridin- <i>p</i> -Toluolsulfonsäure
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
Rh-NHS	Rhodamin- <i>N</i> -Hydroxysuccinimid
(R)-(-)-MTPA-Cl	(<i>R</i>)-(-)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl chlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S	Serin
(S)-(+)-MTPA-Cl	(<i>S</i>)-(+)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl chlorid
SCPL48	Serincarboxylpeptidase 48
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Ser	Serin
SH	Serinhydrolase
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBDMSOTf	<i>tert</i> -Butyltrimethylsilyltriflat
TBTA	Tris(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin

TCEP	Tris(carboxyethyl)phosphin
td	Triplett von Dublett
TEV	<i>Tobacco etchvirus</i>
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMR	Tetramethylrhodamin
TMS	Trimethylsilyl
TMS-Br	Trimethylsilylbromid
TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
TOP	Tandem-orthogonale Proteolyse
Tos-Cl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
TPP2	Tripeptidylpeptidase 2
t_R	Retentionszeit
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
Tri-NP	trifunktionale Nitrophenolsonde
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
UV	Ultraviolett
X	beliebige Aminosäure

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über den Ablauf von ABPP- und CCCP-Experimenten (modifiziert nach Rix <i>et al.</i> ^[6])	27
Abbildung 2: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus einer ABP.	29
Abbildung 3: Klassische reaktive Gruppen, die bei vielen ABP eingesetzt werden. .	30
Abbildung 4: Die vier unterschiedlichen ABP-Klassen.....	32
Abbildung 5: Beim ABPP-verwendete Reportergruppen.	33
Abbildung 6: Gängige Linkervarianten, die bei der Entwicklung chemischer Sonden eingesetzt werden.	34
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines ABPP-Experimentes: Das zu untersuchende Proteom wird mit einer ABP, bestehend aus einer reaktiven Gruppe, einem Linker und einem Reporter markiert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung/Anreicherung der markierten Proteine und deren Detektion bzw. Identifizierung.	35
Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines 2-Stufen-ABPP mit Hilfe von Clickchemie.	36
Abbildung 9: Analyse von ABPP-Experimentem mittels denaturierender Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender In-Gel-Fluoreszenzmessung (bei Verwendung eines Fluorophors als Reporter) (modifiziert nach Cravatt <i>et al.</i> ^[26]).	37
Abbildung 10: Beim ABPP-verwendete LC-MS-Methoden zur Identifizierung markierter Proteine. a) Detektion von Trypsin-verdauten Peptidsequenzen nach Affinitätsaufreinigung und b) Detektion sondenmodifizierte Peptiden nach Trypsinverdau (modifiziert nach Cravatt <i>et al.</i> ^[26]).	38
Abbildung 11: TOP-ABPP Methode (modifiziert nach Cravatt <i>et al.</i> ^[26]).	39
Abbildung 12: Beispiel eines vergleichenden ABPP von menschlichen Krebszellen. Diese Analyse zeigte z. B., dass invasive und nicht-invasive Krebszellen unterschiedliche Enzymaktivitätsmuster aufweisen (modifiziert nach Jessani <i>et al.</i> ^[32]).	40
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines kompetitiven ABPP-Ansatzes zur Bestimmung der Hemmeigenschaften von Inhibitor Kandidaten auf Proteomebene (modifiziert nach Barglow <i>et al.</i> ^[35]).	41
Abbildung 14: Die Struktur des Naturstoffs und Breitbandcysteinproteaseinhibitor E-64 (a) und eine daraus entwickelte ABP für Cysteinproteasen (b).	42

Abbildung 15: Strukturen zweier Breitband-Metallohydrolase-Inhibitoren (a) und einer daraus entwickelten ABP mit einem Benzophenon als Photosonde (b).	43
Abbildung 16: Struktur vom 5'-FSBA und der daraus resultierenden ABP-Sonde....	43
Abbildung 17: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der Serinhydrolasen.....	46
Abbildung 18: Schematische Darstellung zum Einsatz von FP.	46
Abbildung 19: Strukturen der Fluorophosphonatsonden und Arylphosphonatsonden.	47
Abbildung 20: Dreidimensionale Struktur von AeCXE1 (<i>Actinidia eriantha</i>) (a) und daraus abgeleitetes Topologiediagramm (b) (modifiziert nach Ileperuma <i>et al.</i> ^[76]). .	49
Abbildung 21: Konservierter Reaktionsmechanismus.	49
Abbildung 22: Chemische Strukturformel von Paraoxon (a) und der Bindungsmodus der Hemmung von AeCXE1 durch den Inhibitor Paraoxon (b) (modifiziert nach Ileperuma <i>et al.</i> ^[76]).....	50
Abbildung 23: Phylogenetischer Stammbaum (modifiziert nach Allers <i>et al.</i> ^[83]).	52
Abbildung 24: Struktur der Callysponginsäure (1).	56
Abbildung 25: Struktur der Fluorophosphonatsonde 2	58
Abbildung 26: Zielstrukturen der geplanten Nitrophenol-basierten Sonden 3 (mit Alkin-Reporter) und 4 (mit Rhodamin- und Biotin-Reporter).	59
Abbildung 27: Retrosynthese zur Darstellung des Naturstoffes Callysponginsäure (1).	61
Abbildung 28: Syntheseübersicht 1. Baustein	
Abbildung 29: Einführung einer THP-Schutzgruppe an einer Hydroxylgruppe und anschließende Überführung der zweiten Hydroxylgruppe in ein Bromid ergeben Intermediat 13	63
Abbildung 30: Bromierung und anschließendes THP-Schützen von 1,5-Pentandiol (9).	63
Abbildung 31: Einführung einer TBDMS-Schutzgruppe an 17	64
Abbildung 32: Kupplung von 13 und 21	64
Abbildung 33: Kupplung von 13 und 17	65
Abbildung 34: Überführung der Hydroxylgruppe von 14 in ein Bromid führt zu Intermediat 8	65
Abbildung 35: Einführung der TMS-Schutzgruppe an 18	66
Abbildung 36: Kupplung von 8 und 23 nach den Reaktionsbedingungen von Abad <i>et al.</i> ^[113]	66

Abbildung 37: Kupplung von 8 und 18	66
Abbildung 38: Entfernen der THP-Schutzgruppe von 7	67
Abbildung 39: Überführung der Hydroxylgruppe von 25 in einer Tosylgruppe.	67
Abbildung 40: Kupplung von 26 und 27 nach der Vorschrift von Cryle <i>et al.</i> ^[117]	68
Abbildung 41: Versuchte Kupplung von 26 und 28	68
Abbildung 42: Überführung der Hydroxylgruppe von 25 in das Bromid 15	69
Abbildung 43: Iodierung des Tosylats von 26 führt zum Alkyljodid 30	69
Abbildung 44: Einführung der Säure 27	70
Abbildung 45: Darstellung des Alkylbromids 15 , ausgehend von 7	70
Abbildung 46: Versuch der Einführung der Säure am Alkylbromid 15	70
Abbildung 47: Kupplung zu einem Propargylalkohol 16 , ausgehend von 15 und 19 . 71	
Abbildung 48: Jonesoxidation von 16 zur Säure 5	71
Abbildung 49: Syntheseüberblick 2. Baustein.....	72
Abbildung 50: Umlagerungsreaktion.....	72
Abbildung 51: Oxidation von 31	73
Abbildung 52: Wittigreaktion von 38 zu Intermediat 39	74
Abbildung 53: Reduktion des Methylesters 39 zum Alkohol 40	74
Abbildung 54: Oxidation mit Manganoxid zum α,β -ungesättigten Aldehyden 41 und anschließende enantioselektive Umsetzung zum Allylalkohol 42	75
Abbildung 55: Bromierung der Dreifachbindung am 4-Pentin-1-ol (17).	75
Abbildung 56: Bromierung des durch DIBAL-H Reduktion-erhaltenen Intermediates 40	76
Abbildung 57: Bromierung der Dreifachbindung des nach der Wittigreaktion-erhaltenen Intermediates 39	76
Abbildung 58: Reduktion des Methylesters 45 zum Alkohol 44 mit bromierter Dreifachbindung und anschließender Alkinilierung.....	76
Abbildung 59: Iodierung des Alkins von 4-Pentin-1-ol (17).....	77
Abbildung 60: Iodierung des Alkins 31	77
Abbildung 61: DMP-Oxidierung und anschließende Wittigreaktion von 10	78
Abbildung 62: Reduktion von 33 mit DIBAL-H.....	78
Abbildung 63: Oxidation und Alkinylierung zum Intermediat 6	79
Abbildung 64: Testreaktionen zur Cadiot-Chodkiewicz Kupplung der beiden Bausteine.....	80
Abbildung 65: Testkupplung mit Intermediat 25	81
Abbildung 66: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung der Intermediate 25 und 46	81

Abbildung 67: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung des iodierten Alkins 6 mit Intermediat 25	82
Abbildung 68: Bromierung von 51	83
Abbildung 69: Tosylierung von 51	83
Abbildung 70: Cadiot-Chokiewicz Kupplung des tosylierten Alkohols 26 mit 6	84
Abbildung 71: Kupplung von 53 und 27 zur Säure 54	84
Abbildung 72: Einführen einer TBDMS-Schutzgruppe am sekundären Alkohol.	85
Abbildung 73: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung zwischen 16 und 55	85
Abbildung 74: Oxidation von 56 zur Säure 57	86
Abbildung 75: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung.	86
Abbildung 76: Entschützen von 54 zum Zielmolekül Callysponginsäure (1).	87
Abbildung 77: Fluoreszenzgel und Coomassie-gefärbtes Gel des Experimentes mit Callysponginsäure (1 , hier als SN1-300 bezeichnet; das Gel wurde von Herrn Dr. Farnusch Kaschani durchgeführt).	89
Abbildung 78: Syntheseübersicht zur Darstellung des Fluorophosphonats 2	90
Abbildung 79: TBDMS-Schützen einer Alkoholfunktion am Tetraethylenglykol (58). ..	91
Abbildung 80: Einführung einer Iodidabgangsgruppe in 59	91
Abbildung 81: Phosphorylierung von 60 zum Phosponat 61	92
Abbildung 82: Entschützen der TBDMS-geschützten Alkoholfunktion.	93
Abbildung 83: Reaktion mit DSC.	93
Abbildung 84: Hydrolyse von 63 zum Phosphorsäurederivat 66	94
Abbildung 85: Fluorierung von 66 zu 67	94
Abbildung 86: Einführung einer Dreifachbindung an 66	95
Abbildung 87: Reaktion von 63 mit Propargylamin zur Einführung der terminalen Dreifachbindung.	95
Abbildung 88: Hydrolyse des Phosphonatesters 64 und anschließende Fluorierung.	96
Abbildung 89: 1. Versuch zur Darstellung des Nitrophenolderivates 3 , ausgehend von 2	97
Abbildung 90: Chlorierung von 62 und Einführung des Nitrophenols.	97
Abbildung 91: Reaktion von 68 mit Heptanol zu 69	98
Abbildung 92: Chlorierung von 69 und Einführung der Nitrophenolgruppe.	99
Abbildung 93: Darstellung der Fluorophosphonatsonde 73	99
Abbildung 94: Einführung eines Boc-geschützten Aminoalkohols.	100

Abbildung 95: Chlorierung von 74 und anschließende Einführung des Nitrophenols.	
.....	100
Abbildung 96: Versuchte Darstellung der Sonde 76 durch Chlorierung der <i>p</i> -Nitrophenolsonde 3 und anschließende Umsetzung mit dem Boc-geschützten Aminoalkohol.	101
Abbildung 97: Einführung einer Phthalimidgruppe am Phosphonat von Verbindung 68 .	102
Abbildung 98: Chlorierung zur Darstellung eines Chlorophosphonates und anschließende Umsetzung mit <i>p</i> -Nitrophenol zur Sonde 79 .	102
Abbildung 99: Einführung einer Pivalatgruppierung am Derivat 65 .	103
Abbildung 100: Hydrolyse der <i>p</i> -Nitrophenolsonde 3 zur freien Säure 81 .	103
Abbildung 101: Modifizierung von Biotin (82) mit einem Pentandiamin liefert ein Amino-funktionalisiertes Biotin 84 .	104
Abbildung 102: Kupplung von 67 mit 84 führte zum Biotin-Fluorophosphonat-Derivat 85 .	105
Abbildung 103: Kupplung von Biocytin-TMR (86) mit der aktivierten Fluorophosphonatsonde 67 .	106
Abbildung 104: Syntheseübersicht zur Darstellung des Azidlinkers 91 .	107
Abbildung 105: Kupplung von Rhodamin-succinimid (92) bzw. Biotin (82) mit 91 .	108
Abbildung 106: Einführen einer Säurefunktion am Linker 91 .	109
Abbildung 107: Kupplung von 95 mit Biocytin-TMR (86) führte zum trifunktionalen Reporter 96 .	109
Abbildung 108: Übersicht zur verwendeten Clickreaktion zur Darstellung der trifunktionalen Sonden.	110
Abbildung 109: Übersicht über die erfolgreich synthetisierten Sonden.	111
Abbildung 110: Ergebnisse des Labelingexperimentes (A) und der Affinitätsaufreinigung (B). ^[141]	112
Abbildung 111: Gelbild des Experimentes mit Clickchemieansatz. ^[141]	113
Abbildung 112: Agroinfiltrationsexperiment. ^[141]	114
Abbildung 113: Fluoreszenzgelbild zur Überprüfung der Labelling-Effizienz der einzelnen Phosphonatsonden (aufgenommen von Herrn Dr. Farnusch Kaschani).	116
Abbildung 114: Experiment mit thermophilen Archaea-Bakterien (zusammen mit Dr. Farnusch Kaschani).	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für im klinischen Tests erprobte menschliche Serinhydrolaseinhibitoren. ^[57]	45
--	----

1. Einleitung

1.1 Chemische Proteomik

1.1.1 Einführung

Durch die Komplettierung der Sequenzierung des menschlichen Genoms verfügen wir heute über eine Vielzahl von Geninformationen, welche eine unschätzbare Hilfe zur Erforschung der molekularen Ursachen von Krankheiten darstellen. Um jedoch die Biologie eines lebenden Organismus bzw. einer Krankheit vollständig zu verstehen, sind diese auf DNA- bzw. RNA-Ebene gewonnenen Daten alleine nicht ausreichend. Stattdessen sind auch direkte Untersuchungen der biologisch-relevanten Proteine und ihrer posttranslationalen Modifikationen notwendig. Systematische Untersuchungen auf dieser Ebene werden dabei häufig unter dem Begriff der „Proteomik“ zusammengefasst. Dabei wird in der Proteomik versucht, zu einem bestimmten Zeitpunkt die Gesamtheit aller Proteine incl. ihrer posttranslationalen Modifikationen zu erfassen. Dementsprechend muss für jedes Protein einer Zelle die Struktur, die Funktion, die Expression, die zelluläre Lokalisation, die Wechselwirkungspartner und die Regulierung bestimmt werden.^[1]

Es ist offensichtlich, dass dies ein schwerwiegendes Unterfangen ist und z. B. eine verlässliche Messung und Auswertung großer Datenmengen erfordert. Daher wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Alternativansätzen entwickelt, welche eine Erfassung von ausgewählten Proteinen (sogenannten Sub-Proteomen) innerhalb des Proteoms ermöglichen. Solche Ansätze ermöglichen eine signifikante Verringerung der Komplexität der zu analysierenden Proteinmixturen und somit einen geringeren Meß- und Analyseaufwand. Verwendet man zur Auswahl bestimmter Proteine niedermolekulare, chemische Verbindungen (sogenannte „small molecules“), bezeichnet man einen solchen „Reduktions-Ansatz“ als chemische Proteomik.^[2] In der chemischen Proteomik finden dementsprechend Methoden der organischen Chemie, Zellbiologie, Biochemie und Massenspektrometrie Anwendung.^[1] In den letzten Jahren sind dabei verschiedene Ansätze zur Durchführung chemischer Proteomikuntersuchungen entwickelt worden. Zu den wichtigsten gehören das „aktivitätsbasierte Protein-Profilng“ (activity-based protein profiling, ABPP), welches eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität einzelner Proteinfamilien unter nativen Bedingungen ermöglicht, und zum anderen die „Verbindungs-zentrierte chemische

Proteomik“ (compound-centered chemical proteomics, CCCP), die sich mit der Charakterisierung des molekularen Mechanismus eines small molecules beschäftigt. Auf die Technik des ABPP wird im Folgenden (Kapitel 1.1.2) noch genauer eingegangen. Beim CCCP werden die direkten Bindungspartner von small molecules bestimmt. Hierzu wird z. B. die seit vielen Jahren bekannte, klassische Wirkstoff-Affinitäts-Chromatographie^[3] eingesetzt und mit einer modernen hochauflösenden Massenspektrometrie kombiniert (für einen typischen Ablauf eines CCCP-Experimentes bzw. eines ABPP-Ansatzes, siehe Abb. 1^[4-5]). Die Ergebnisse eines CCCP-Experimentes geben im Vergleich zum ABPP-Ansatz keinen Aufschluss über den Aktivitätszustand des Proteins, aber sie können Zielstrukturen bioaktiver Komponenten identifizieren.^[6-7]

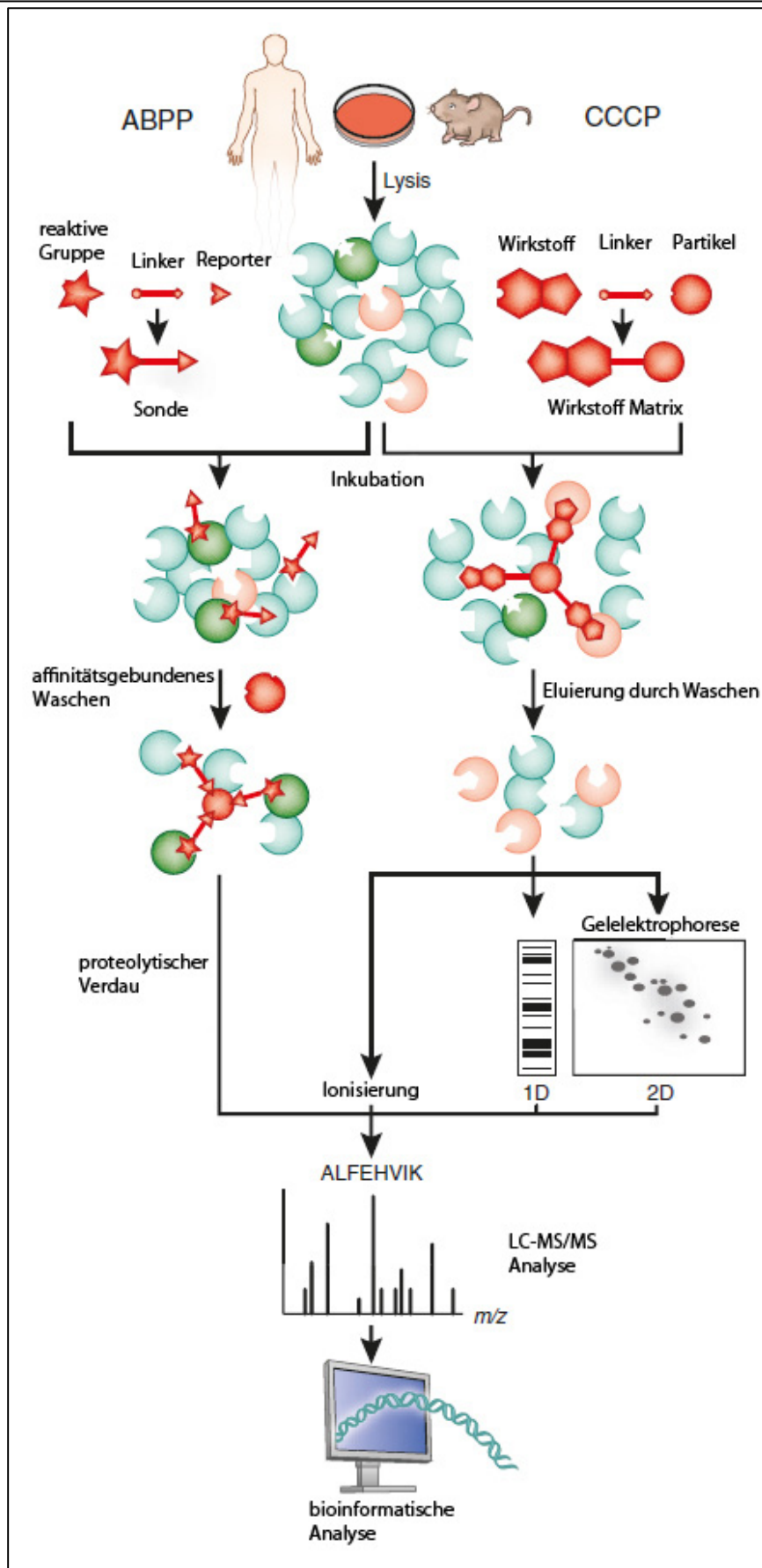


Abbildung1: Übersicht über den Ablauf von ABPP- und CCCP-Experimenten (modifiziert nach Rix et al.^[8])

In beiden Ansätze spielt somit die chemische Sonde bzw. der Wirkstoff die zentrale Rolle. Dementsprechend müssen diese so hergestellt werden, dass sie mit den verwendeten Methoden kompatibel sind und eine starke Bindung bzw. Wechselwirkung mit dem Protein eingehen. Beim Design solcher Sonden müssen oft schwierige chemischen Hürden genommen werden, um das häufig chemisch bereits stark funktionalisierte Molekül regioselektiv mit weiteren funktionellen Gruppen zu modifizieren, die zur Immobilisierung im Falle von CCCP oder zur Anbringung eines Reporters im Falle von ABPP benötigt werden.

Der Vorteil der chemischen Proteomik ist deren vielfältige Einsetzbarkeit, z. B. in verschiedenen Zelltypen, Geweben oder anderen Arten von biologischen Materialien.^[8] In der Tat gibt es zurzeit keine vergleichbar effiziente und Zell-/Gewebe-/Organismus-unabhängige Methode, welche auf der einen Seite das effiziente Auffinden neuer Zielproteine für Wirkstoffe bzw. auf der anderen Seite eine Identifizierung und Validierung von Zielproteinen von Wirkstoffen, deren Wirkmechanismus bisher unbekannt war, ermöglicht.^[9-10]

Allerdings existieren neben diesen unbestrittenen Vorteilen auch immer noch einige Nachteile: So werden die zu untersuchenden Proteingemische häufig durch Lyse des biologischen Materials hergestellt; bei dieser Methode gehen jedoch einige Proteine verloren. Eine besondere Herausforderung stellen dabei die Membranproteine dar, da sie spezielle Löslichkeitsbedingungen benötigen, welche mit den Bedingungen für „lösliche“ Proteine inkompatibel sind. Ein weiteres Problem stellen abundante Proteine dar, welche durch unselektive Wechselwirkungen (sogenannte „off-target“-Effekte) mit den Wirkstoffen häufig hohe Hintergrundsignale erzeugen. Zudem ist es häufig schwierig, in chemischen Proteomik-Experimenten zwischen direkten und indirekten Bindungssubstraten zu unterscheiden, was die Auswahl einer negativen Kontrolle erschwert; nichtsdestotrotz ist diese jedoch zwingend notwendig, um selektive Bindung nachweisen zu können.^[8] Neben diesen eher technischen Aspekten limitiert natürlich auch insbesondere die begrenzte Anzahl unterschiedlicher chemischer Sonden eine allgemeine Anwendung der chemischen Proteomik. Deshalb sind weitere Anstrengungen zur Entwicklung alternativer chemischer Sonden, welche z. B. direkt in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen eingesetzt werden können, weiterhin erforderlich.

1.1.2 Aktivitäts-basiertes Protein Profiling (ABPP)

1.1.2.1 Einführung

Das aktivitätsbasierte Protein-Profilung (ABPP) ist eine besondere Methode der chemischen Proteomik und dient zur Messung des Aktivitätszustandes einzelner Enzymfamilien unter physiologischen Bedingungen. ABPP ermöglicht somit nicht nur die Abundanz von Enzymen zu messen, sondern diese in aktive oder inaktive, welche z. B. als Zymogen oder Inhibitor-gebundenen vorliegen, zu unterscheiden.^[11-13]

Das Herzstück dieser Methode ist dabei ein small molecule mit modularem Aufbau, die sogenannte aktivitätsbasierte Sonde (activity-based probe, ABP), welche zur Analyse des Proteoms verwendet wird.^[14] Die ABP's bestehen in der Regel aus 3 Basiselementen (Abb. 2):

- 1) die reaktiven, funktionelle Gruppe, die in der Lage ist, kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms zu binden,
- 2) dem Reporter, der zur Identifizierung und/ oder Aufreinigung des modifizierten Enzyms dient, und
- 3) dem Linker, der zum einen die beiden Elemente verbindet, aber auch einen Einfluss auf die Selektivität der Probe haben kann.^[15]

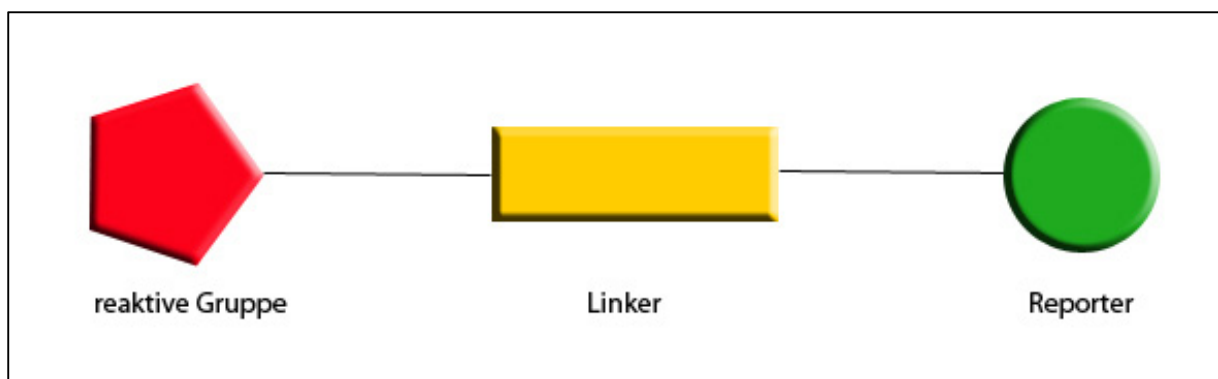


Abbildung2: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus einer ABP.

Seit Einführung dieser Methode in den 1990ern wurde eine Vielzahl von kleinen Molekülen synthetisiert, die mit diversen Enzymklassen (z. B. Proteasen,^[16-18] Glycosidasen,^[19] Kinasen,^[20] Phosphatasen^[21]) reagieren.

1.1.2.2 Die Elemente einer ABP: die reaktive Gruppe

Die reaktive, funktionelle Gruppe ist das wichtigste Element einer ABP. Auf der einen Seite muss sie über genügend Reaktivität verfügen, um auch latente Nucleophile zu modifizieren, auf der anderen Seite darf die chemische Reaktivität jedoch nicht zu unspezifischen Modifikationen von anderen Molekülen innerhalb des Proteoms führen, die in ihrer Menge überwiegen. Der Großteil der heute bekannten ABP's nutzt elektrophile Gruppen, die von irreversiblen Enzyminhibitoren abgeleitet wurden und deren Fähigkeit, kovalente Bindungen mit nucleophilen Gruppen in der aktiven Tasche des Enzyms (in der Regel mit der katalytisch-aktiven Aminosäure) zu bilden bereits bekannt waren.^[15, 22]

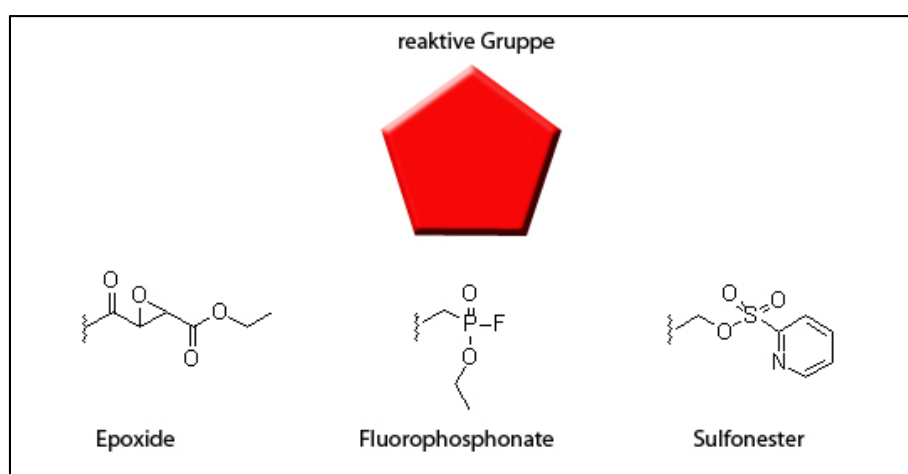


Abbildung 3: Klassische reaktive Gruppen, die bei vielen ABP eingesetzt werden.

In der Regel unterscheidet man vier unterschiedliche Klassen von ABP's: ABPs der ersten beiden Klassen (I und II) basieren auf einem mechanismusbasierten Design oder sind Suizidinhibitoren, die aktive Enzyme zur Reaktion benötigen. Im Fall von Typ I-Sonden ist das Schlüsselnucleophil der katalytische Rest des Enzyms, der normalerweise am Angriff auf das Substrat beteiligt ist. Diese Sonden können selektiv synthetisiert werden, indem sie auf den katalytischen Mechanismus des Zielenzyms abgestimmt werden. Beispiele für diesen Typ sind Epoxid-basierte Sonden, wie z. B. die bekannte ABP DCG-04, einer Sonde zum Profiling von Cysteinproteasen (Mechanismus siehe Abb.4),^[23] oder auf Fluorophosphonat-basierende ABP wie z. B. FP, eine Breitbandsonde für Serinhydrolasen.^[13] Demgegenüber beinhalten Typ II-Sonden ein maskiertes Electrophil, dessen Aktivität erst durch die Reaktion mit dem Nucleophil zum Einsatz kommt. Das unmaskierte Electrophil ist dann in der Lage mit einer im aktiven Zentrum lokalisierten, nucleophilen Gruppe zu reagieren. Verbindungen dieser Klasse werden häufig auch

als Suizidsubstrate bezeichnet. So gehören z. B. die Verbindung Sublactam,^[24] ein β -Lactamaseinhibitor oder das DFPP als Alkylierungsreagenz für Phosphatasen zu dieser Gruppe (Mechanismus siehe Abb.4).^[25-26] Da bei diesen Sonden jedoch der Schritt der „Demaskierung“ und der Bioreaktion mit dem Zielprotein zeitlich getrennt sind, kann es bei einigen dieser Sonden zu einer unspezifischen Reaktion der demaskierten Elektrophile mit anderen Proteinen kommen, wodurch das Hintergrundsignal erhöht wird.^[27] Dieses Problem kann jedoch durch Einführung von Spezifitätselementen an die Sonde verhindert werden. Die affinitätsalkylierenden Sonden (AFBP's, Typ III) besitzen eine affinitätsbasierte Markierungsgruppe, die zur Reaktion nur ein starkes Nucleophil oder Elektrophil in der Nachbarschaft der aktiven Tasche benötigt und kein voll aktiviertes Enzym. Sie messen somit im Prinzip die freie Zugänglichkeit zur Bindungstasche. Ein Beispiel hierzu ist 5'-FSBA (5'-Fluorosulfonylbenzoyladenosen), welches ein potenter Inhibitor für Proteinkinasen oder Nukleotidbindungsproteinen ist (Mechanismus siehe Abb. 4). Zur letzten Gruppe (Typ IV) gehören ABPs, welche nicht-spezifische alkylierende Gruppen enthalten; diese reagieren aufgrund ihrer intrinsischen Reaktivität mit Zielenzymen an spezifischen Aminosäureresten, wie z. B. Cystein. Zu dieser Gruppe gehören z. B. ABPs mit einer Iodoacetamidgruppe (Mechanismus siehe Abb.4), welche in der isotopenmarkierten Affinitätsmethode (ICAT) oder aber beim globalen Reaktivitätsprofiling eingesetzt werden.^[28-29]

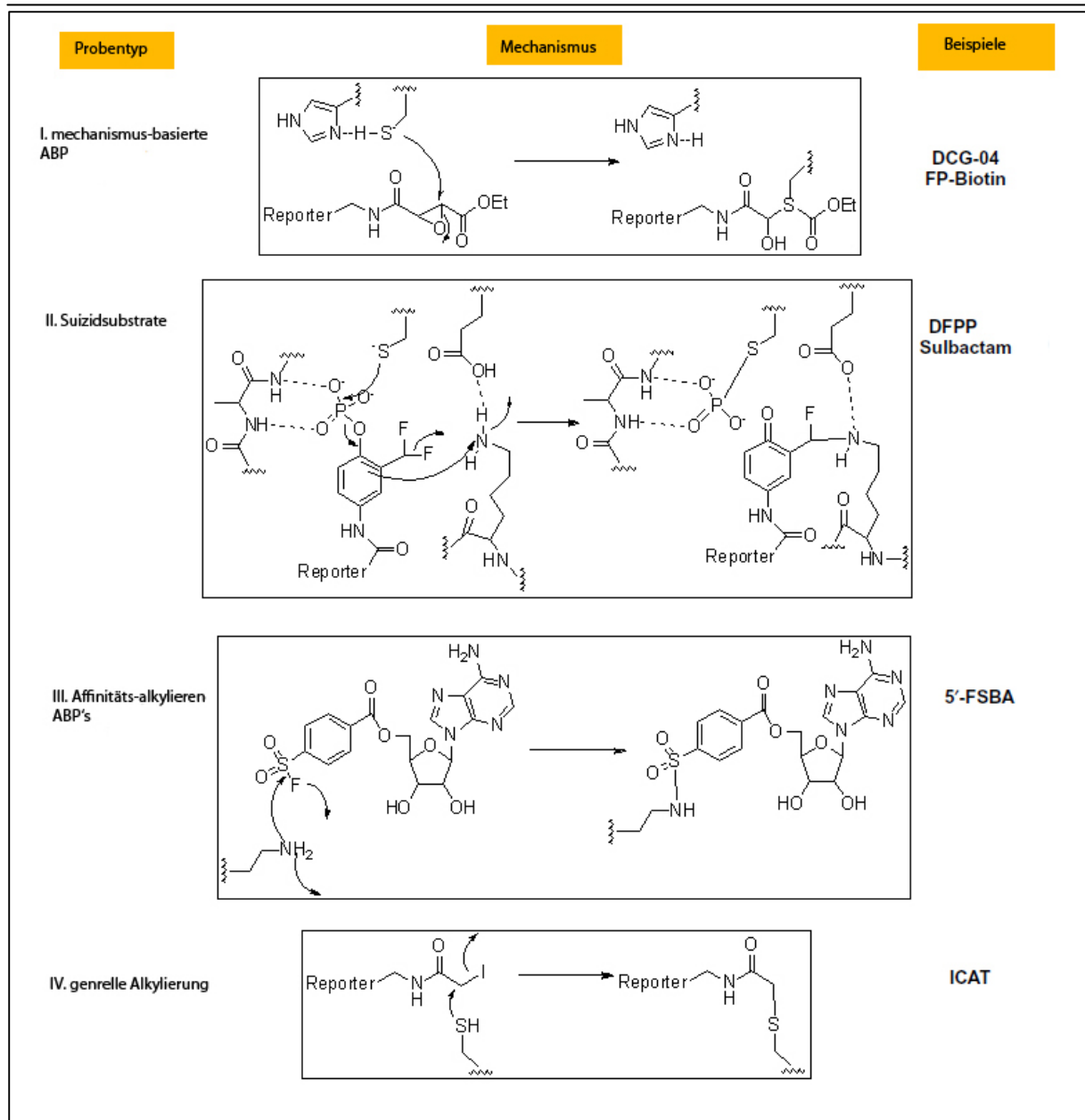


Abbildung4: Die vier unterschiedlichen ABP-Klassen.

Die ABPs können auf zwei Arten synthetisiert werden. Zum einen kann das Design auf einem direkten Ansatz beruhen. Beim direkten Ansatz werden ABPs für bestimmte Enzymklassen entwickelt, für welche bereits Inhibitoren bzw. der katalytische Mechanismus bekannt ist (Bsp.: FP für Serinhydrolasen.^[13, 18] Beim indirekten Ansatz werden mehrere strukturverschiedene Sonden in einer Bibliothek synthetisiert und das gesamte Proteom wird mit Hilfe dieser Sonden auf potenzielle Kandidaten getestet.^[14]

1.1.2.3 Die Elemente einer ABP: Der Reporter

Beim Reporter handelt es sich um das Element, welches zur Identifizierung mittels ABPP-markierter Proteine und auch häufig zur Aufreinigung der modifizierten Enzyme verwendet wird. Es handelt sich meistens um Biotin, fluoreszente oder radioaktive Moleküle.^[1] Darüberhinaus finden in den letzten Jahren häufig auch sogenannte „minimale“ Reporter Verwendung (siehe Kapitel 1.1.2.6). Diese sind meistens terminale Alkin- oder Azidgruppen, welche mittels Click-Chemie nach dem Markieren des Proteoms mit Reportergruppen modifiziert werden können.^[30]

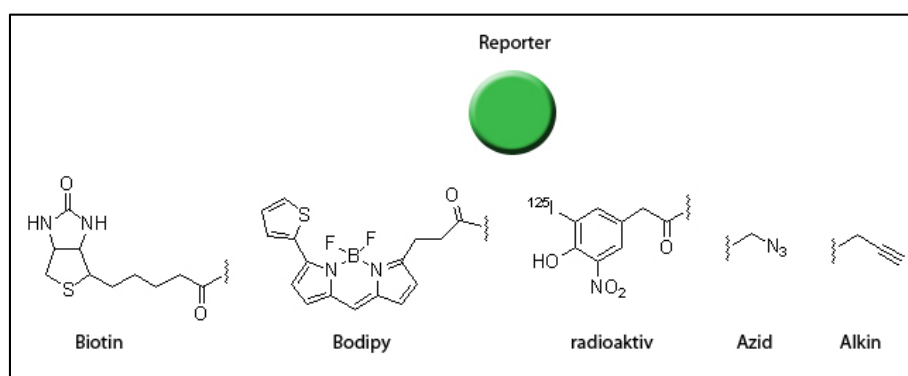


Abbildung5: Beim ABPP-verwendete Reportergruppen.

Da nach der Reaktion der Sonde mit dem Enzym eine Anreicherung der modifizierten Proteine erfolgen muss, bietet sich als günstigste und schnellste Methode die Gelelektrophorese über SDS-PAGE an. Das hat zur Folge, dass die Reporter den dort verwendeten Bedingungen standhalten müssen. Biotin-modifizierte Sonden können anschließend durch einen einfachen Westerblot mit Hilfe von Avidin gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht werden. Demgegenüber können fluoreszent- oder radioaktiv-markierte Enzyme durch direktes Scannen im Gel (durch einen Fluoreszenzscanner oder Phosphorimager) sichtbar gemacht werden. Die zuletzt genannten Reporter haben gegenüber Biotin einige Vorteile: Sie sind in der Handhabung einfacher und schneller und sensitiver in der Detektion. Aufgrund Fluorophor-abhängiger Anregungs- und Emissionsspektren der Reporter lassen sich in einem Experiment darüber hinaus verschiedene Fluorophor-Reporter gleichzeitig einsetzen, so dass man Messergebnisse leicht quantitativ erfassen kann.^[10, 18] Der Biotinreporter wird dennoch weiterhin verwendet werden, da er sich nicht nur zur Detektion, sondern auch zur Aufreinigung mit Streptavidin-Agarose-Beads eignet.^[31] Da eine effiziente Aufreinigung die Identifizierung von modifizierten Enzymen erheblich vereinfacht, werden heutzutage häufig Reportergruppen eingesetzt, welche sowohl einen Fluorophor als auch eine Biotingruppe tragen.^[1]

1.1.2.4 Die Elemente einer ABP: Der Linker

Der Linker dient in erster Linie dazu, die reaktive Gruppe mit dem Reporter zu verbinden. Dabei wird dessen Länge und chemische Funktionalität so gewählt, dass er einerseits eine eventuelle sterische Hinderung vermeidet und somit der Zugang der reaktiven Gruppe zum Enzym nicht durch den Reporter blockiert. Andererseits sollte der Linker so gewählt sein, dass die ABP möglichst günstige pharmakokinetische Eigenschaften zeigt.^[1]

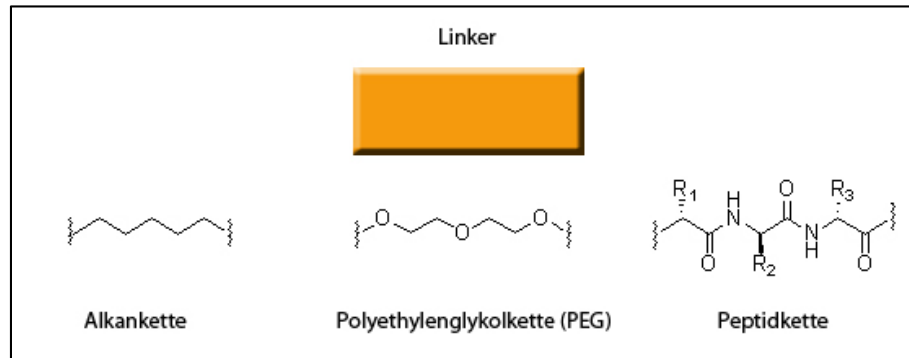


Abbildung6: Gängige Linkervarianten, die bei der Entwicklung chemischer Sonden eingesetzt werden. Als einfache „Platzhalter“ zwischen den reaktiven und der Reportergruppe werden z. B. langkettige Alkyl- oder PEG- (Polyethylenglykol)- Ketten verwendet. Der Alkyllinker kann die Hydrophobizität einer Sonde beeinflussen, und somit den Zugang zur lebenden Zelle ermöglichen. Der PEG-Linker verleiht einer sehr hydrophoben Sonde dagegen häufig eine bessere Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Der Linker kann jedoch auch andere spezifische Elemente beinhalten, die zur Selektivität einer Sonde für ein bestimmtes Enzym oder einer Enzymfamilie beitragen (Bsp: DCG04).^[15, 23] Diese spezifischen Elemente sind meistens Peptide oder peptidähnliche Strukturen, so dass eine spezifischere Bindung in die aktive Tasche des Zielproteins erreicht werden kann. Ein neuer Fokus liegt auf der Verwendung von spaltbaren Linker. Diese finden z. B. bei Biotin-Reportern häufige Anwendung, da eine chemische Spaltung des Linkers nach einer Aufreinigung an Streptavidin (bzw. Avidin) eine milde und selektive Eluierung der sondengebundenen Proteine von der festen Phase erlauben.^[1, 32]

1.1.2.5 Die Durchführung von ABPP-Experimenten

Ein ABPP-Experiment basiert auf der Bildung einer kovalenten und somit normalerweise unter denaturierenden Bedingungen irreversiblen Bindung zwischen der Sonde und dem Protein. Die erfolgte Bindung ist dabei aktivitätsabhängig, d.h. eine Reaktion findet nur statt, wenn sich das zu messende Enzym in einem aktiven Zustand befindet.

Hierzu wird das zu untersuchende Proteom mit der ABP inkubiert. Im Anschluss findet eine Identifizierung bzw. Aufreinigung/Anreicherung je nach ausgewähltem Reporter statt.^[13]

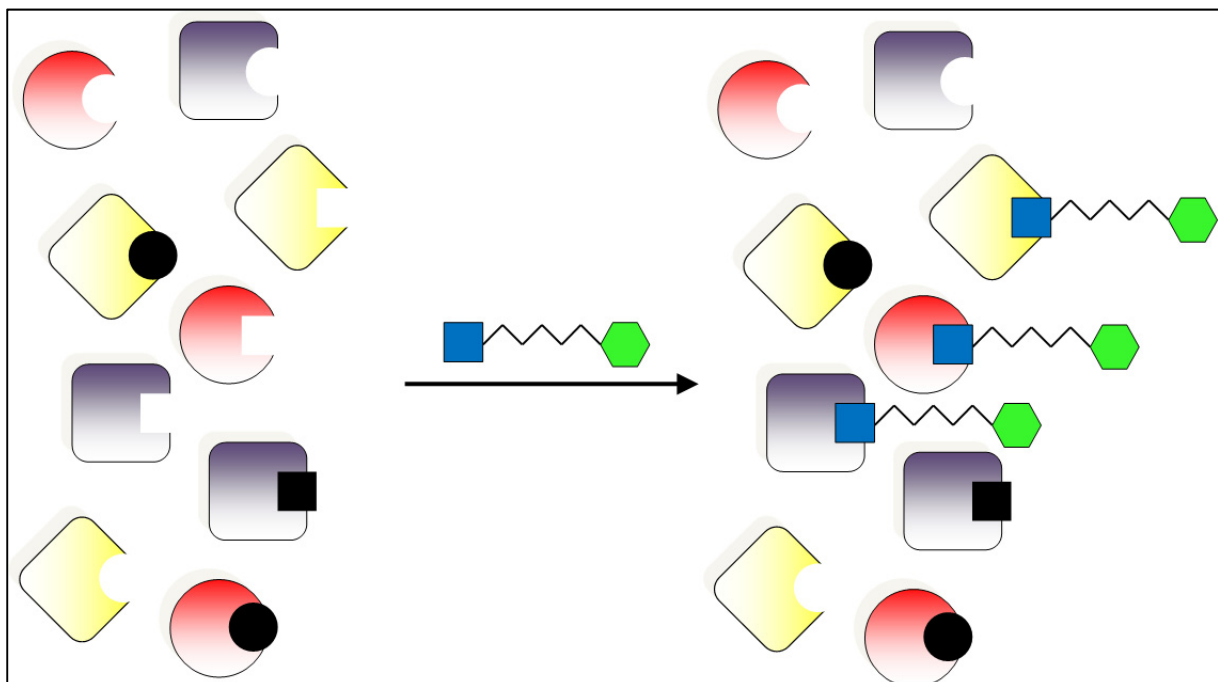


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines ABPP-Experimentes: Das zu untersuchende Proteom wird mit einer ABP, bestehend aus einer reaktiven Gruppe, einem Linker und einem Reporter markiert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung/Anreicherung der markierten Proteine und deren Detektion bzw. Identifizierung.

Wie bereits oben beschrieben, ist die Reaktivität der ABPs dabei so gewählt, dass diese nur mit einem Teil des verwendeten Proteoms, nämlich der aktiven Enzyme innerhalb der von den ABP-adressierten Enzymfamilien, reagieren. Mit Hilfe eines geeigneten Reporters wie z.B. Biotin können die modifizierten Proteine dann isoliert und gereinigt werden und anschließend einer eingehenden Analyse unterzogen werden.^[2]

1.1.2.6 2-Stufen-ABPP

Da Reporter wie z. B. Biotin oder Fluorophore relativ große Moleküle darstellen und die daraus gebildeten ABPs deswegen häufig z. B. nicht mehr zellgängig sind, wurde in den letzten Jahren nach Möglichkeiten der nachträglichen (d.h. nach der Proteommarkierung mit den ABPs) Einführung des Reporters gesucht. Dazu wird ein Paar von bioorthogonal reaktiven chemischen Einheiten verwendet, die nach erfolgter Bioreaktion der ABPs mit ihren Proteintargets miteinander gekuppelt werden können. Die zwei prominentesten, bei ABPP-Ansätzen verwendeten Kupplungsreaktionen sind die Staudinger-Ligation,^[33] bei welcher ein Phosphan und ein Azid als Kupplungspartner verwendet werden, und die als Clickreaktion bekannte Huisgens-1,3-dipolare Cycloaddition, bei der ein Azid mit einem Alkin unter Bildung eines Triazols gekuppelt wird.^[34] Da die miteinander-kuppelnden funktionalen Gruppen im Gegensatz zu Biotin- oder Fluorophorreportern räumlich sehr klein sind, bezeichnet man die verwendeten Reporter auch als Minimal-Reporter. Eine weitere Bezeichnung für eine ABPP mittels dieser Reportergruppen ist ein sogenanntes 2-Stufen-ABPP (two step labelling), da das Verfahren zwei diskrete Schritte enthält: zuerst die Markierungsreaktion mit der ABP mit dem Minimalreporter und ein zweiter Schritt (z. B. Clickreaktion) zur Anbringung einer größeren Reportergruppe wie einen Fluorophor oder Biotin (Abb. 8).^[30]

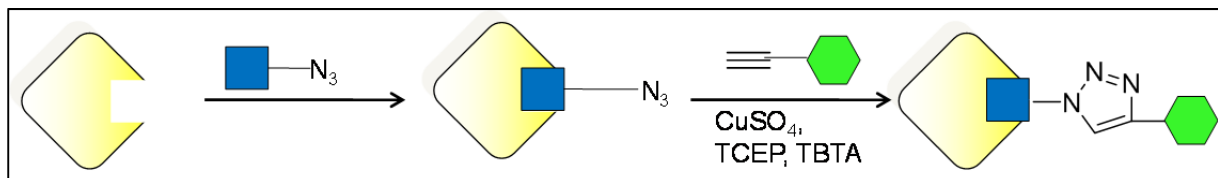


Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines 2-Stufen-ABPP mit Hilfe von Clickchemie.

Die Click-Reaktion wird dabei in Gegenwart von TCEP (Tris(carboxyethyl)phosphin) als reduzierendes Reagenz und TBTA (Tris(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) als stabilisierender Ligand für den Cu(I)-Katalysator durchgeführt. Die Einführung des Reporters nach der Markierung die Sondenaufnahme ermöglicht somit auf technisch relative einfache Art und Weise die Durchführung von ABPP-Experimenten *in vivo*.^[30]

1.1.2.7 Analyseplattformen

Wie bei allen biologischen Experimenten muss auch beim ABPP die verwendete analytische Plattform auf das jeweilige Experiment angepasst werden, um somit den Informationsgehalt des Experimentes zu maximieren. Die am häufigsten verwendete Analysemethode beim ABPP ist dabei die denaturierende Gelelektrophorese.^[12-13, 18] Hierzu werden die mit den Sonden inkubierten Proteome über 1D- oder 2D-PAGE separiert und anschließend durch In-Gel-Fluoreszenzscannen oder Avidin-Blotting analysiert.^[35]

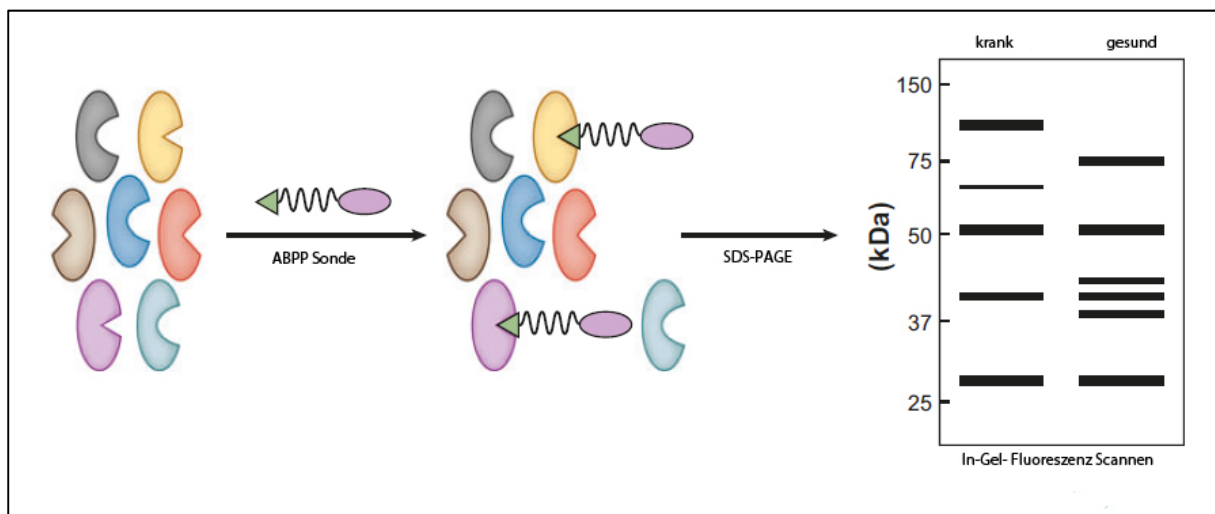


Abbildung 9: Analyse von ABPP-Experimenten mittels denaturierender Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender In-Gel-Fluoreszenzmessung (bei Verwendung eines Fluorophors als Reporter) (modifiziert nach Cravatt *et al.*^[35]).

Um die Identität durch ABP-markierter Proteine aufzuklären, werden meistens massenspektrometrische Messungen durchgeführt. Hierzu werden die durch die ABP-markierten Proteine zumeist erst durch eine Affinitätsaufreinigung einer biotinylierten Sonde an Streptavidin erreicht. Bei dieser Methode stellt die massenspektrometrische Auflösung eine starke Limitierung dar, so dass diese hauptsächlich auf LC-MS- (Flüssigchromatographie gekoppelt mitnachfolgender Massenspektrometrie) Methoden basieren. Dabei erfolgt die Analyse über zwei Strategien (Abb. 10): In der ersten Strategie werden meistens biotinylierte Sonden eingesetzt. Nach der Inkubation des Proteoms erfolgt mittels (Strept)Avidin eine Affinitätsaufreinigung sondenmarkierter Proteine,^[36] gefolgt von einem tryptischen Verdau und LC-MS/MS Analyse der so erhaltenen Peptide, häufig mittels der multidimensionalen Proteinidentifikationsmethode (MudPIT). Vergleich der detektierten Peptidsequenzen mit in Datenbanken gespeicherten Proteinsequenzen ermöglicht dann die Identifizierung der markierten Proteine. Allerdings ermöglicht

dieser Ansatz keine geradlinige Identifizierung der eigentlichen sondenmodifizierten Peptiden.^[37-38] Deshalb wurde eine zweite Strategie, nämlich die Methode des Peptidprofiling aufgrund ihrer Aktivitätsstellen (ASPP) eingeführt.^[39-40] Bei diesem Ansatz findet der Verdau der markierten Proteine vor der Inkubation mit (Strept)Avidin statt, gefolgt durch eine LC-MS/MS- und Datenbankanalyse der erhaltenen Methoden. Durch Bestimmung des sondenmodifizierten Peptides kann sichergestellt werden, dass die ABP-Markierung an der katalytisch-aktiven Aminosäure erfolgte.^[35, 41]

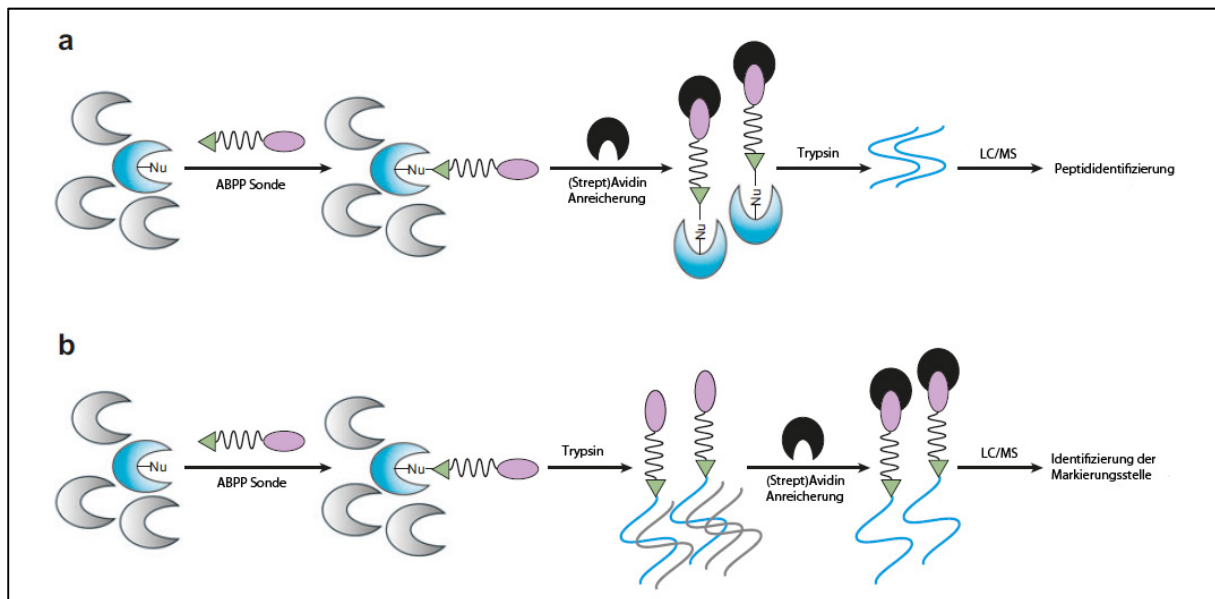


Abbildung 10: Beim ABPP-verwendete LC-MS-Methoden zur Identifizierung markierter Proteine. a) Detektion von Trypsin-verdauten Peptidsequenzen nach Affinitätsaufreinigung und b) Detektion sondenmodifizierter Peptiden nach Trypsinverdau (modifiziert nach Cravatt *et al.*^[35]).

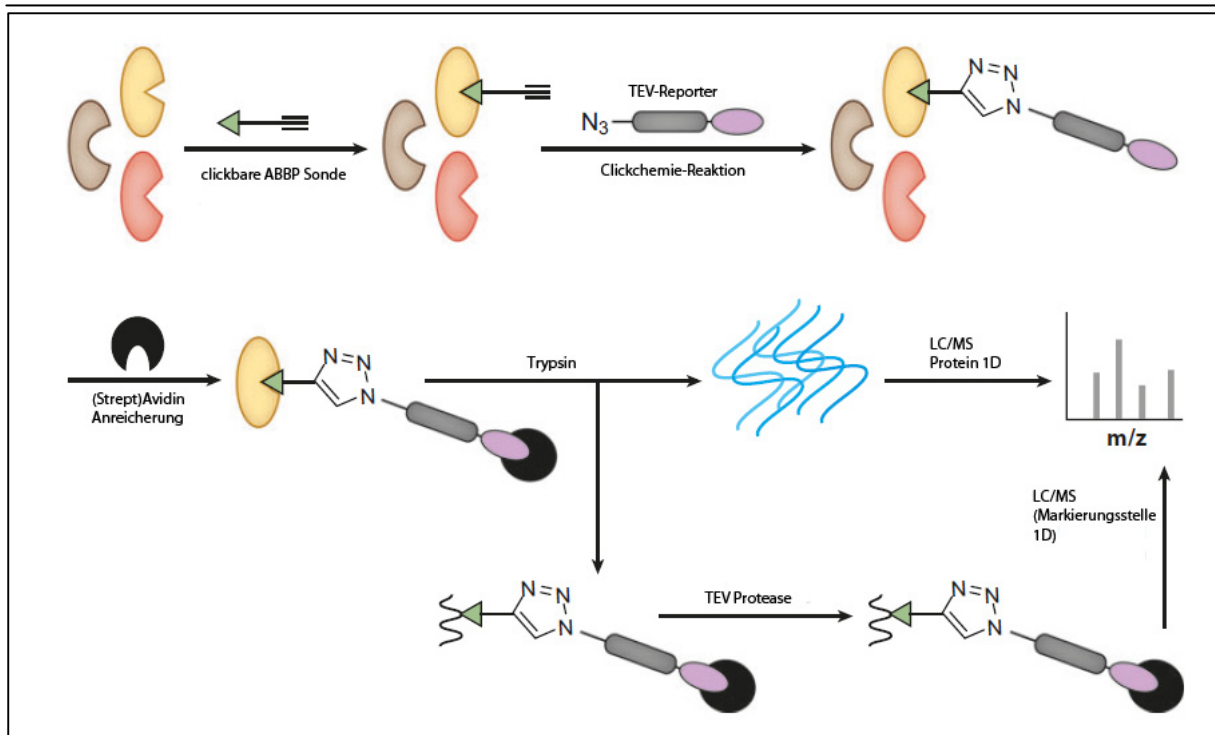


Abbildung 11: TOP-ABPP Methode (modifiziert nach Cravatt *et al.*^[35]).

Ein weiterer Ansatz, der die beiden vorangegangenen ineinander vereint, ist die Tandem-orthogonale Proteolyse (TOP) gekoppelt mit ABPP. Bei dieser Methode wird eine TEV- (*Tobacco etchvirus*) Proteasespaltstelle zwischen der reaktiven Gruppe und dem Biotin eingefügt. Diese TEV-Biotin-Gruppe wird mittels Clickchemie an die reaktive Gruppe angefügt. Anschließend wird mit (Strept)Avidin behandelt und simultan ein tryptischer Verdau sowie eine TEV-Spaltung mittels TEV-Protease durchgeführt. Beides wird über LC-MS/MS analysiert, wodurch eine gleichzeitige Identifizierung der durch die ABPs markierten Enzymen und ihrer spezifischen Bindungsstellen möglich wird.^[30, 42]

1.1.2.8 Komparatives vs. Kompetitives ABPP

Die klassische Variante des ABPP ist das vergleichende Verfahren (comparative ABPP, Abb. 12). Bei dieser Methode werden zwei oder mehr Proteome bezüglich ihrer Enzymaktivitäten miteinander verglichen. Weisen die Proteome z. B. unterschiedliche biologische Eigenschaften auf (z. B. gesund gegen normal), können die somit erhaltenen Enzymaktivitätsmuster einen Einblick in die molekularen Ursachen der Krankheit geben und somit eventuell als Biomarker dienen.^[35]

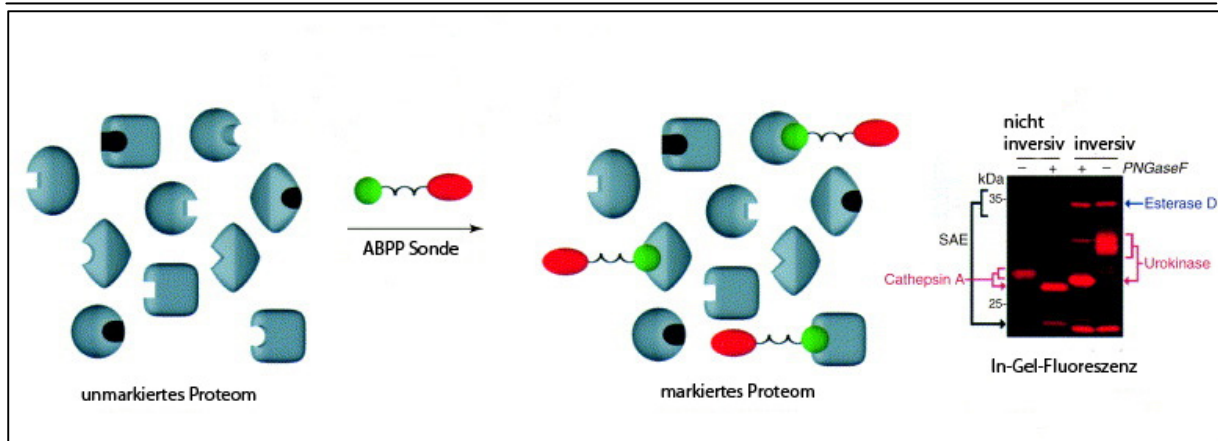


Abbildung 12: Beispiel eines vergleichenden ABPP von menschlichen Krebszellen. Diese Analyse zeigte z. B., dass invasive und nicht-invasive Krebszellen unterschiedliche Enzymaktivitätsmuster aufweisen (modifiziert nach Jessani *et al.*^[43]).

Alternativ wird ABPP auch in einem kompetitiven Ansatz durchgeführt (competitive ABPP, Abb. 13). Bei diesem Verfahren können z. B. die Hemmeigenschaften von small molecules auf Proteomebene analysiert werden. Hierzu werden die zu untersuchenden Proteome mit Bibliotheken von Inhibitorkandidaten preinkubiert ;^[10, 44] anschließend wird mittels eines ABPP-Experimentes das Inhibitorprofil der Verbindungen detektiert, indem die Hemmung der ABP-vermittelten Sondenmarkierung durch die niedermolekularen Wirkstoffe evaluiert wird.^[10, 12, 44] Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass die Enzyme in ihrer nativen Umgebung getestet werden, und somit die sonst benötigten rekombinanten Expressionen und Aufreinigungen wegfallen. Des Weiteren lassen sich somit häufig neue Zielproteine für bekannte Inhibitoren auffinden.^[35, 37, 45-46]

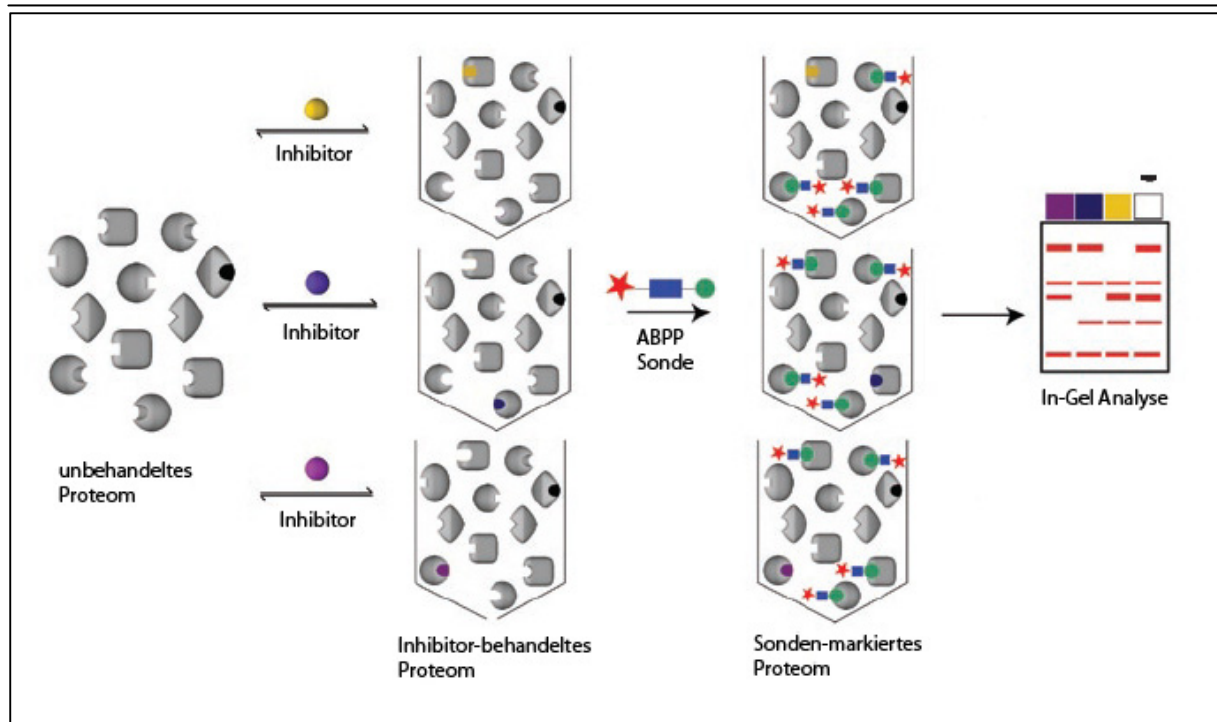


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines kompetitiven ABPP-Ansatzes zur Bestimmung der Hemmeigenschaften von Inhibitorkandidaten auf Proteomebene (modifiziert nach Barglow *et al.*^[47]).

1.1.2.9 Beispiele für Enzymklassenspezifische ABP-Sonden

Für eine Vielzahl von Proteinfamilien sind mittlerweile ABP entwickelt worden. Insbesondere für Serin- und Cysteinproteasen steht mittlerweile eine Vielzahl von mechanismusbasierten ABPs zur Verfügung. Diese stellen besonders geeignete Zielproteine für ABPP dar, da der Katalysemechanismus über die Bildung eines kurzlebigen, nichtsdestotrotz kovalenten Acyl-Enzym-Intermediats erfolgt. Somit lässt sich dieser kovalente Zwischenschritt mittels einer geeigneten ABP „abfangen“.^[48] Auf die Serinhydrolasen wird im folgenden Kapitel noch näher eingegangen (siehe Kapitel 1.3). Stattdessen soll an dieser Stelle kurz beispielhaft auf weitere, durch ABPP adressierbare Enzymklassen eingegangen werden.

Die Cysteinproteasen sind eine große Enzymklasse, deren Mitglieder unzählige kritische Funktionen in prokaryotischen und eukaryotischen Organismen übernehmen. Ihr katalytischer Mechanismus macht sie empfänglich für die Inaktivierung durch verschiedene Elektrophile, z. B. Epoxiden, Vinylsulfonen, Diazomethylketonen, α -Haloketonen und Acyloxymethylketone.^[49] Die bekannteste Sonde ist DCG-04, eine vom Naturstoff E-64 abgeleiteter Epoxid-basierende ABP.^[11]

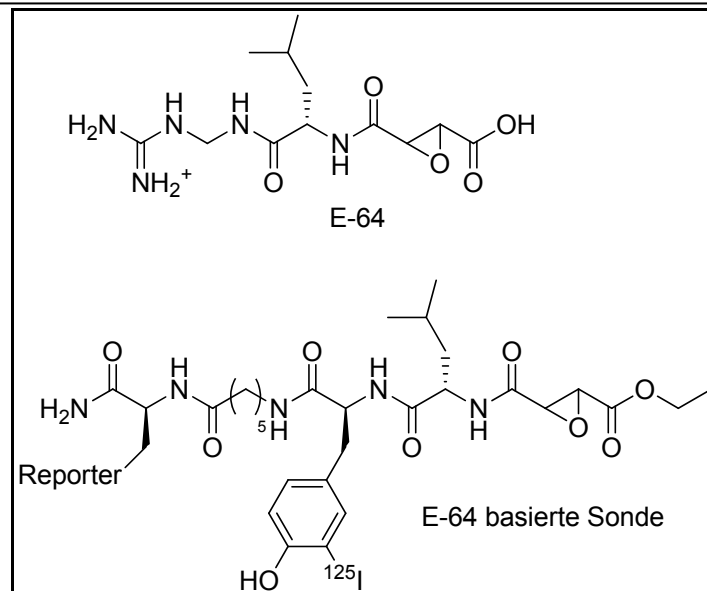


Abbildung 14: Die Struktur des Naturstoffs und Breitbandcysteinproteaseinhibitor E-64 (a) und eine daraus entwickelte ABP für Cysteinproteasen (b).

Zur Gruppe der Metallohydrolasen gehören Proteasen, Peptidasen und Deacetylasen. Sie erreichen die Hydrolyse durch ein Zink-aktiviertes Wassermolekül und somit nicht über einen kovalenten Übergangszustand/Intermediat. Dieser Unterschied im Mechanismus verkompliziert das Design von elektrophilen ABPs. Als Alternative wurden deshalb photoreaktive Varianten der reversiblen Inhibitoren der Metallohydrolasen entwickelt.^[38, 50-51] Die Sonden erreichen ihre Selektivität durch Bindungsaffinität anstelle von mechanismusbasierter Reaktivität. Die benötigte kovalente Markierung wird durch Verwendung von UV-Licht erreicht, wodurch die photoreaktive Gruppe aktiviert wird und mit Proteinen in der unmittelbaren Umgebung reagiert.^[35]

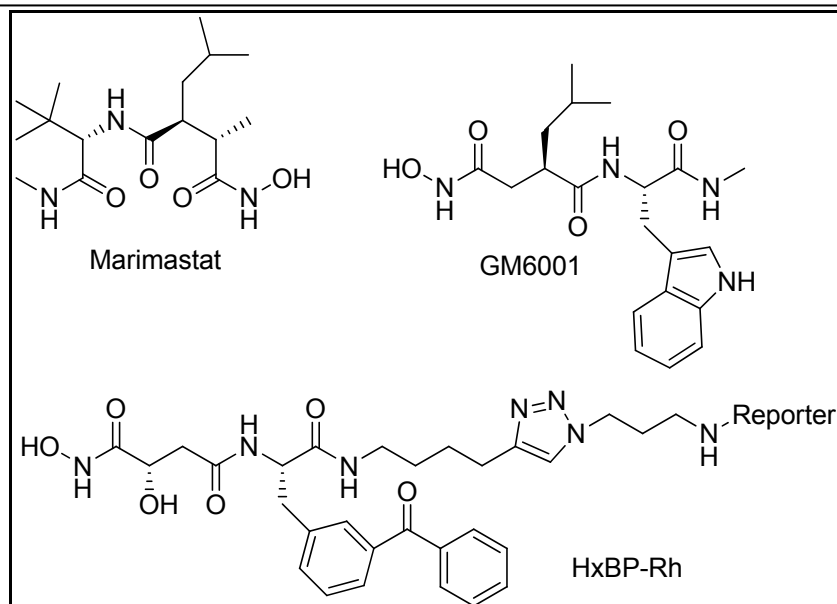


Abbildung 15: Strukturen zweier Breitband-Metallohydrolase-Inhibitoren (a) und einer daraus entwickelten ABP mit einem Benzophenon als Photosonde (b).

Eine weitere wichtige Enzymfamilie sind die Proteinkinasen, von denen ungefähr 500 verschiedene im menschlichen Genom codiert sind. Die Aktivität von Proteinkinasen ist hochreguliert und spielt eine kritische Rolle bei fast allen biologischen Prozessen.^[52-53] Jedoch verfügen Proteinkinasen über kein reaktives Nucleophil am eigentlichen aktiven Zentrum der Kinase. Daher wurden Sonden entwickelt, welche mit einer dem aktiven Zentrum „randständigen“ nucleophilen Gruppe reagieren können. Ein Beispiel für eine solcher Inhibitor ist 5'-FSBA,^[54] der zusammen mit der dazugehörigen Acylphosphat ATP-Sonde in der folgenden Abbildung (Abb. 15) dargestellt ist.^[20]

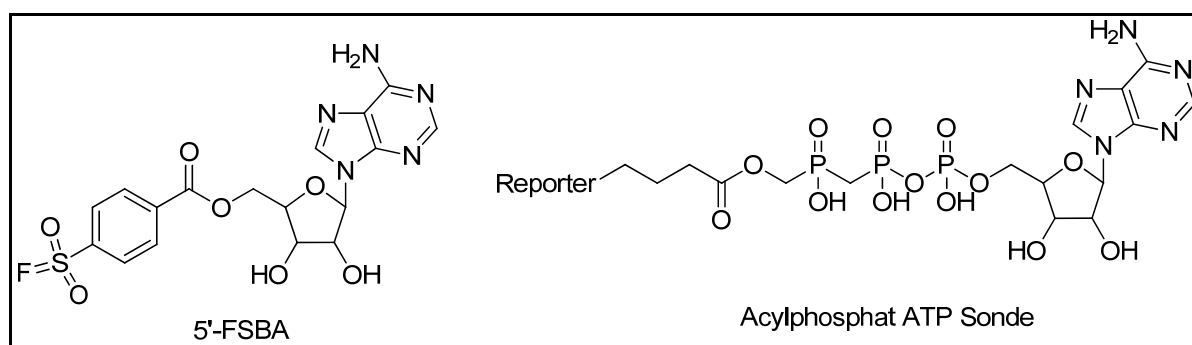


Abbildung 16: Struktur vom 5'-FSBA und der daraus resultierenden ABP-Sonde.

Die Phosphatasen sind die biologischen „Gegenspieler“ der Kinasen und stellen ein ideales Ziel für das Design von ABP's, da im katalytischen Zentrum ein Cystein lokalisiert ist, welches während des Enzymmechanismus als nucleophiles Thiolat agiert. Dementsprechend wurde für diese Enzymklasse bereits eine Vielzahl

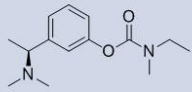
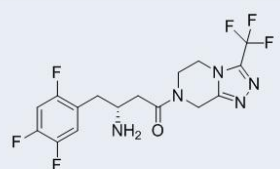
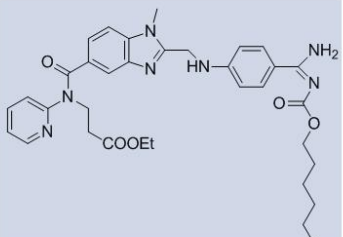
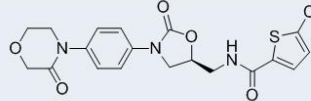
unterschiedlicher Sonden entwickelt, z. B. Suizidsubstrate mit maskierten Elektrophilen.^[55-56] In den meisten Fällen jedoch sind die erhaltenen Sonden nicht zellgängig, weil diese Sonden auf hochgeladenen Phosphatmimetika basieren.

1.3 Serinhyrolasen

1.3.1. Einführung in die Klasse der Serinhydrolasen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ABPs für Serinhydrolasen entwickelt. Daher soll hier kurz auf deren besondere biologische Eigenschaften eingegangen werden. Die Klasse der Serinhydrolasen (SH) stellt eine der größten und am meisten diverse Enzymklasse in höheren Eukaryoten dar. SHs codieren ungefähr 3% des Drosophila Proteoms und ungefähr 1% des menschlichen Genoms.^[52, 57-58] Sie sind in eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen wie die Blutgerinnung,^[59] die T-Zelltoxizität,^[60] Entzündungen,^[61] neurale Plastizität,^[62] Neurotransmitter Katabolismus,^[63-64] Peptid-/Proteinaufbau,^[65] Protein-/Lipidverdau,^[66] Angiogenese,^[67] Emphysema und Krebs involviert.^[43, 68-69] Zudem übernehmen sie wichtige Funktionen in Bakterien und Viren, z. B. innerhalb des pathogenen Lebenszyklus,^[70] in der Virulenz und auch der Wirkstoffresistenz.^[71-72] Die meisten Enzyme hydrolisieren Metaboliten, Peptide oder posttranslationale Ester und Thiolester. Durch ihre große biologische Bedeutung wurde eine Vielzahl klinischer Wirkstoffe für diese Enzymklasse entwickelt, um z. B. Krankheiten wie Fettleibigkeit,^[73] Diabetes,^[74] mikrobielle Infektionen und Alzheimer zu behandeln.^[75-76]

Tabelle 1: Beispiele für in klinischen Tests erprobte menschliche Serinhydrolaseinhibitoren.^[77-82]

Zielprotein	Indikation	Verbindung (Verkaufsname)	Struktur	Firma
Acetylcholin- esterase	Alzheimer verbunden mit Demenz	Rivastigmin (Exelon)		Novartis
Dipeptidyl- peptidase 4	Typ II Diabetes	Sitagliptin (Januvia)		Merck
Thrombin	Thrombose	Dabigatranetexilat (Pradaxa)		Boehringer Ingelheim
Faktor Xa	Thrombose	Rivaroxaban (Xarelto)		Bayer

Serinproteasen spielen auch eine große Rolle im Lebenszyklus des Influenzavirus, da das virale Hemagglutinin als ein Vorläuferprotein synthetisiert wird und einer proteolytischen Reifung unterzogen werden muss.^[83] Im menschlichen Genom finden sich mehr als 100 Serinproteasen, aber auch rund 110 weitere Serinhydrolasen, die keine Peptide als Substrate aufweisen, sondern hauptsächlich mit Metaboliten reagieren (mSHs). Zu den mSHs zählen Esterasen, Lipasen, aber auch einige Peptidasen und Amidasen, die in verschiedenen Unterfamilien organisiert werden können, basierend auf ihre 3D-Struktur und ihrem katalytischen Mechanismus. Die Mehrheit der mSH's (>60%) nehmen ein $\alpha\beta$ -Hydrolase-Faltblatt ein und verwenden Ser-His-Asp (Serin-Histidin-Aspartat) als katalytische Triade.^[84] Fast die Hälfte aller mSHs sind bisher bzgl. ihrer physiologischen Substrate und Funktionen weitgehend uncharakterisiert.^[85] Allen Serinhydrolasen wird ein gemeinsamer katalytischer Mechanismus zugeordnet, welcher die Aktivierung eines konservierten Serinnucleophils für den Angriff auf die Substrat-Ester/Thioester/Amid-Bindung und die Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediates beinhaltet. Die folgende Wasser-katalysierte Hydrolyse des Intermediates führt zur Freisetzung des Produktes (siehe Abb. 16).^[86]

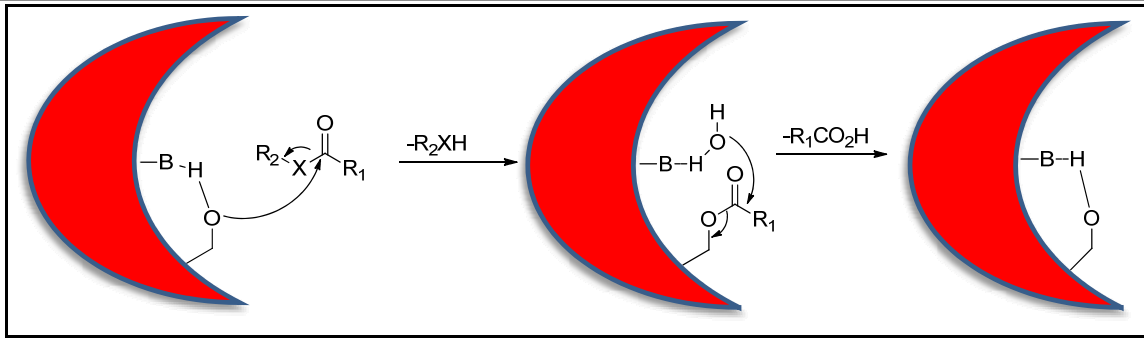


Abbildung 17: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der Serinhydrolasen.

Viele SH' sind dabei durch posttranslationale Mechanismen reguliert, so dass ihre enzymatische Aktivität nicht zwingend mit ihrem Expressionslevel korreliert, welches durch gewöhnliche Proteomik-Methoden bestimmt wird.^[35, 87-89] Dementsprechend bietet sich insbesondere bei dieser Familie ABPP zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität und damit zur Untersuchung der physiologischen Funktion der SHs als Methode der Wahl an. Die am meisten genutzte ABP für Serinhydrolasen enthält ein Fluorophosphonat (sogenanntes FP) als reaktive Gruppe, die kovalent mit dem konservierten Serinnucleophil in der aktiven Tasche des Enzyms reagiert.^[35, 90]

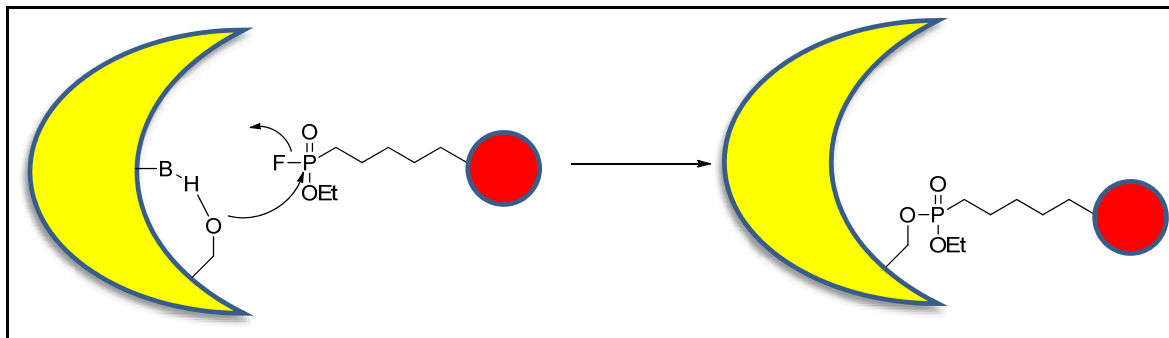


Abbildung 18: Schematische Darstellung zum Einsatz von FP.

Eine globale Analyse von Geweben und Zelllinien-Proteomen ergab, dass mehr als 80% der metabolischen SHs in Säugetieren mit der Fluorophosphonatprobe (FP) reagieren.^[36-37, 40, 91-93] Die Selektivität von FP kann dabei partiell durch Variation der Linkereinheit verändert werden;^[12] so konnte z. B. mit ein Linker mit einem peptidischen Arylphosphonat die Markierungsrate und auch die Selektivität für einzelne SHs drastisch gesteigert werden.^[94-95]

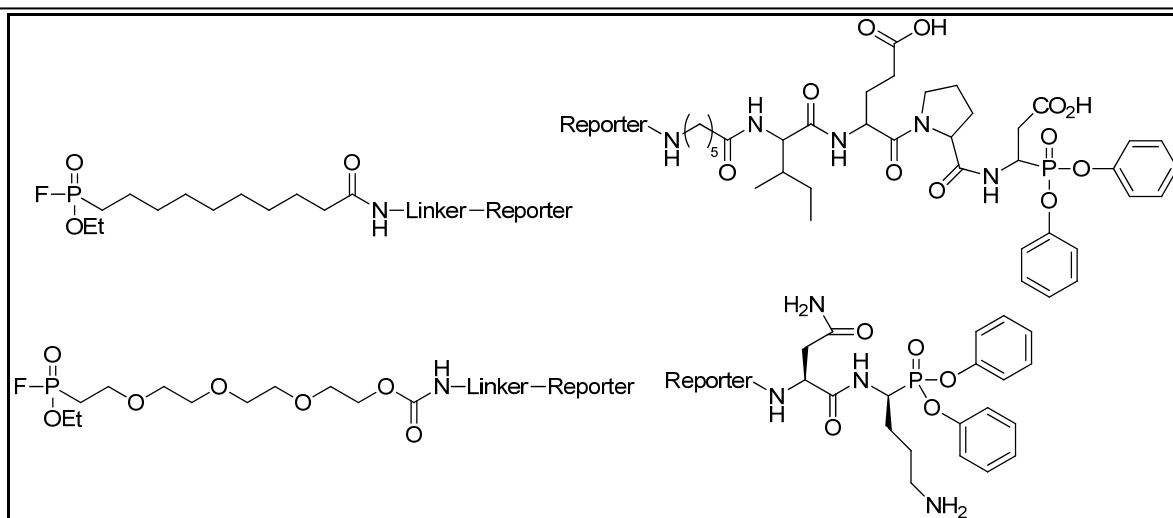


Abbildung 19: Strukturen der Fluorophosphonatsonden und Arylphosphonatsonden.

Des Weiteren wurde FP intensiv in kompetitiven ABPP-Experimenten eingesetzt. Mittels dieser Sonde konnten z. B. Inhibitoren für verschiedene, biologisch-hochrelevante SHs wie z. B. das endocannabinoidabbauende Enzym FAAH,^[44, 96-97] MAGL oder das krebsassoziierte Enzym KIAA1363 entwickelt werden.^[68, 98]

Die hohe Nucleophilie des katalytischen Serins macht jedoch eine kovalente Modifikation mit einer Vielzahl chemisch-diverser Elektrophile möglich.^[36, 40, 45] Als mögliche chemische Sonden (neben FP) sind bisher vier Klassen verwendet worden: Zum einen konnten Naturstoffe aufgefunden werden, welche in Sonden verwandelt werden können. Alternativ lassen sich Substrate durch rationales Design in chemische Sonden umwandeln. Des Weiteren haben sich High-Throughput Screens als interessante Quelle für die Entwicklung von Sonden herausgestellt. Als letzte Gruppe sind chemische Sonden zu nennen, welche aus einer Weiterentwicklung einer vorher bereits etablierten Leitstruktur entwickelt wurden, indem man z. B. reaktive, elektrophile Gruppen (Carbamate,^[99-100] Harnstoffe,^[101] aktivierte Ketone,^[44] Lactone, Lactame^[62, 102]) anfügte.

Trotz dieser großen Anzahl an möglichen Sonden besteht weiterhin ein Bedarf an neuen SH-ABPs, da viele der bisher bekannten Sonden nicht alle SHs adressieren können oder aber diese für einen bestimmten Einsatz (z. B. ungewöhnliche physiologische Bedingungen, siehe *Archaea*-Bakterien) nicht kompatibel sind.

1.3.2 Carboxylesterasen – eine biologisch-relevante Unterfamilie der Serinhydrolasen

Da im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit pflanzliche Carboxylesterasen als Ziel einer entwickelten Sonde identifiziert wurde, soll an dieser Stelle kurz auf die besonderen biologischen Eigenschaften von Carboxylesterasen, insbesondere in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, eingegangen werden. Dabei soll das Augenmerk auf Carboxylesterasen liegen, welche zur Familie der Serinhydrolasen gehören.

Die Bildung und das Aufbrechen von Carboxylesterbindungen sind fundamentale Reaktionen in der organischen Chemie, wobei der Ester in biologischen Systemen häufig weniger reaktiv ist als der jeweilige Alkohol und die Säure. Bei Synthesen mit vielen Schritten kann die Esterbildung einer Säurefunktion daher vor ungewollten Nebenreaktionen schützen und im letzten Schritt durch selektive Hydrolyse wieder freigesetzt werden. Vom chemischen Standpunkt aus gesehen, bietet die Hydrolyse von Carbonsäuren in biologischen Prozessen eine potentielle regulierende Funktion in der Synthese und der Freisetzung von bioaktiven Metaboliten. Da die Esterhydrolyse innerhalb der Zelle stattfindet, wo die Reaktionsraten unter physiologischen Bedingungen sehr langsam sind, nutzen Pflanzen und andere Organismen katalytische Proteine zur Carboxylesterhydrolyse.^[103] Die sogenannten Carboxylesterasen hydrolisieren Ester von kurzkettigen Fettsäuren und haben verschiedene Rollen in Tieren, z. B. in der Signaltransduktion ^[104-105] und der Detoxifikation von Xenobiotika.^[106-107] In Pflanzen ist bisher jedoch wenig über ihre Rolle bekannt.

In *Arabidopsis thaliana* wurden 20 Carboxylesterase-Gene (*AtCXE*) identifiziert. Sie teilen sich konservierte Sequenzmotive und Charakteristika der Sekundärstruktur mit bekannten Carboxylesterasen und anderen Mitgliedern der großen Familie mit einem $\alpha\beta$ -Hydrolase-Faltblatt.^[108-110] Die Mitglieder dieser Familie besitzen eine konservierte Kernstruktur aus 8 β -Strängen, die mit α -Helices und Loops durchsetzt sind. Ihre konservierte katalytische Triade beinhaltet ein nucleophiles Serin, ein Säurerest (Glutamat oder Aspartat) und Histidin.^[110-111] In den meisten Pflanzen ist die Säure ein Aspartat. Diese aktiven Reste sind über die gesamte primäre Peptidsequenz verteilt, befinden sich aber innerhalb der tertiären Struktur in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander.^[110] Strukturelle Daten sind bisher nur für wenige Pflanzen-Carboxylesterasen erhältlich. Eine Ausnahme ist die Struktur der

Carboxylesterase 1 aus *Actinidia eriantha*, welche im Jahre 2007 berichtet wurde (Abb. 27,^[112]).

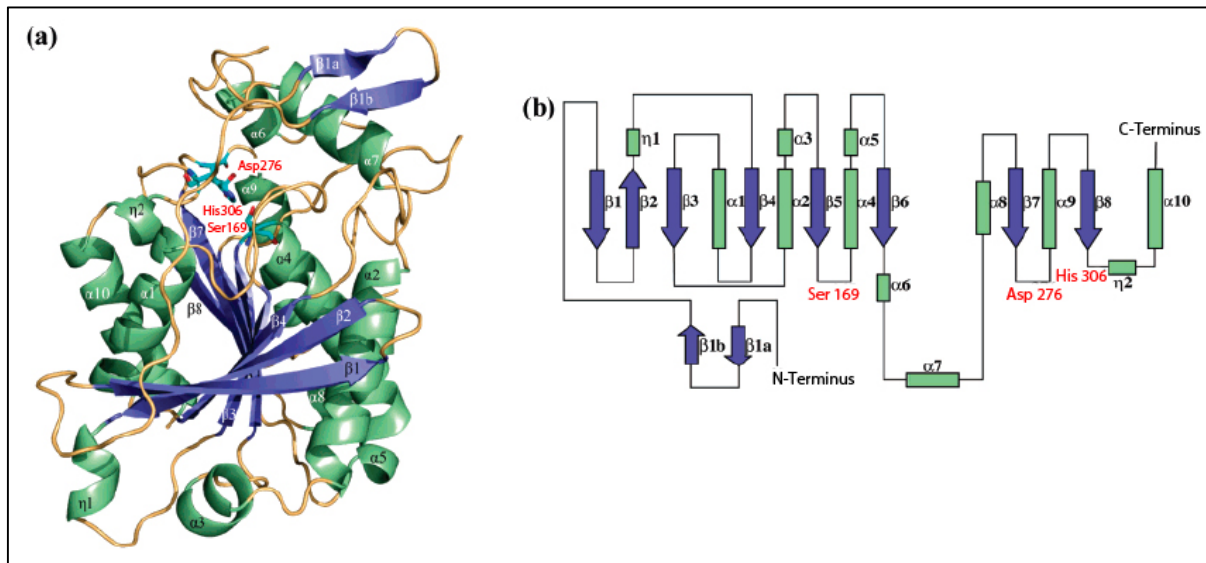


Abbildung 20: Dreidimensionale Struktur von AeCXE1 (*Actinidia eriantha*) (a) und daraus abgeleitetes Topologiediagramm (b) (modifiziert nach Ieperuma *et al.*^[112]).

Diese Strukturanalyse offenbarte weitgehende strukturelle Ähnlichkeiten zwischen pflanzlichen und den besser charakterisierten tierischen Carboxylesterasen. Im Allgemeinen befindet sich bei pflanzlichen Carboxylesterasen das katalytische Serin innerhalb der Basiskernstruktur des Faltblattes auf dem Loop direkt nach dem β-Strang 5, der Säurerest folgt nach dem β-Strang 7 und das Histidin ist nach dem letzten β-Strang lokalisiert. Die Nebeneinanderstellung aller drei aktiven Reste innerhalb des gefalteten Proteins ist nötig für die Aktivierung des katalytischen Serins. Diese Aktivierung findet durch eine Ladungsweitergabe statt, in der die Säure ein Proton vom Histidin abzieht, welches das Proton vom Serin anzieht und somit das nucleophile Serin gebildet wird.^[110]

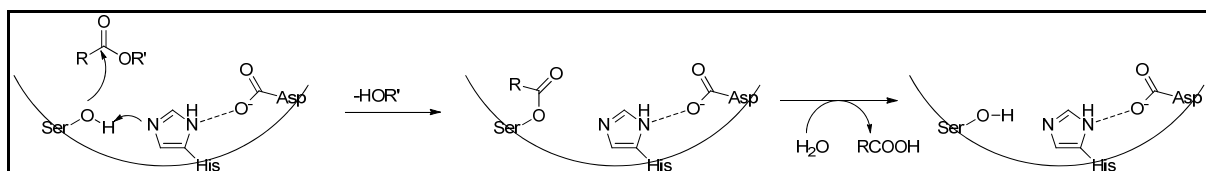


Abbildung 21: Konservierter Reaktionsmechanismus.

Das katalytische Serin ist eingebettet in ein charakteristisches Pentapeptid-Motiv G-X-S-X-G. Dieses Motiv sorgt dafür, dass das Serin ins aktive Zentrum hineinreicht, indem es eine straffe Biegung direkt nach dem β-Strang 5 bewirkt, und wird daher oft als nucleophiler Ellbogen bezeichnet. Ein weiteres wichtiges Strukturelement ist das

Oxyanion-Hole. Dieses ist an der Stabilisierung des tetrahedralen Substrat-Enzym-Intermediats beteiligt und wird aus zwei Glycinresten zwischen β -Strang 3 und α -Helix 1 gebildet.^[110] Zur Einteilung von CXE's wurde 1953 vom Toxikologen W.N. Aldridge eine Klassifizierung basierend auf der Reaktion mit Organophosphonaten vorgeschlagen.^[113] So gehören alle CXEs, die von Organophosphonaten inhibiert werden, zur Klasse B. Organophosphonat- hydrolysierende Enzyme gehören zur Klasse A, währenddessen Klasse C CXE's nicht mit Organophosphonaten interagieren. Zur Klasse D gehören jene CXEs, welche nicht mit Organophosphonaten interagieren, aber sensitiv gegenüber Thiolalkylierungsreagenzien sind.^[113-114]

In Pflanzen werden viele endogene Signalmoleküle als inaktive Esterkonjugate gelagert und werden hochreguliert durch CXEs in ihre biologisch aktive Form hydrolysiert. Die bekanntesten Beispiele hierfür ist die CXE-vermittelte Hydrolyse der Methylester der Salicylsäure und der Jasmonsäure.^[115] Des Weiteren werden viele Herbizide bei ihrer Applikation als inaktive, proherbizidale Carboxylester eingesetzt, wodurch ihre Aufnahme durch die wachsartige Haut der Pflanzen verbessert wird. Nach Aufnahme in die Pflanzen erfolgt dann die CXE-katalysierte Hydrolyse zur Freisetzung des eigentlichen phytotoxischen Wirkstoffes.^[116-117] Bekanntestes Beispiel hierfür ist Paraoxon, ein kommerziell erhältliches Mittel gegen Insekten auf Erntefeldern. Neben seiner Wirkung auf Insekten wird der eingesetzte Wirkstoff Thiol-Parathion jedoch auch teilweise in Pflanzen zum aktiven Metabolit Paraoxon umgesetzt. Das „freie“ Paraoxon wirkt dann als Inhibitor, unter anderem von Carboxylesterasen wie z. B. der Carboxylesterase AeCXE1 (Abb. 23, ^[112]).

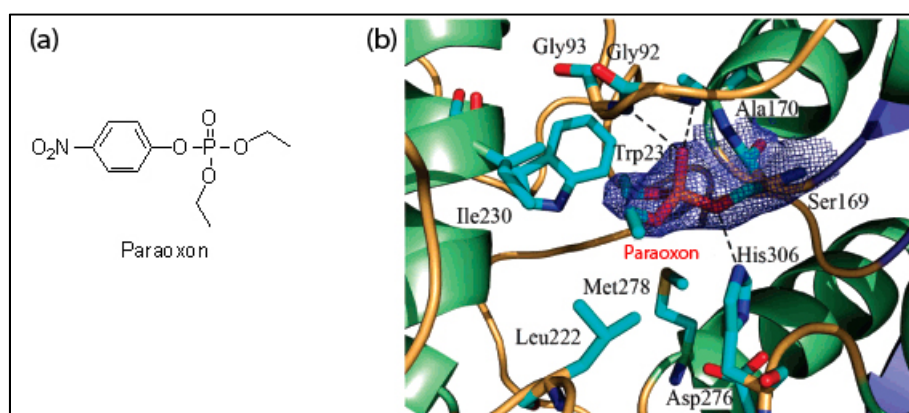


Abbildung 22: Chemische Strukturformel von Paraoxon (a) und der Bindungsmodus der Hemmung von AeCXE1 durch den Inhibitor Paraoxon (b) (modifiziert nach Ileperuma *et al.*^[112]).

Eine Strukturanalyse dieser Interaktion zeigte, dass das Paraoxon kovalent über die Phosphatgruppe an das aktive Serin 169 bindet. Diese Bindung ahmt somit das tetraedrale Intermediat des Reaktionsmechanismus der Carboxylesterasen nach. Die Elektronendichte zeigt keine *p*-Nitrophenolgruppe und belegt somit den Abgangsgruppencharakter dieser funktionellen Einheit. Eine der beiden Ethylgruppen ragt in die Acyl-Bindungstasche, wohingegen die andere aus der Tasche heraus zur Oberfläche des Proteins zeigt.^[112]

Trotz der großen Relevanz von CXEs in Pflanzen ist bisher jedoch wenig über ihre genauen physiologischen Funktionen bekannt. So vermutet man z. B., dass vier der in Pflanzen gefundenen CXE's in Pflanzen-Pathogen-Wechselwirkungen involviert sind;^[118-121] der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt. Das Missverhältnis zwischen biologischer Relevanz und Wissenstand liegt unter anderem daran, dass zur Untersuchung der vermutlich teilweise redundant-wirkenden CXEs keine geeigneten Forschungsansätze zur Verfügung stehen. Dies soll im Rahmen dieser Arbeit angegangen werden (siehe hierzu auch Abschnitt 2, Zielsetzung der Arbeit).

1.4 Archaea-Bakterien

In der Mikrobiologie bestand lange Zeit ein Problem der phylogenetischen Anordnung einzelner Bakterienarten. Dabei handelte es sich um eine Gruppe an anaeroben „Bakterien“ mit der Fähigkeit zur Produktion von Methan, die aber keine klassischen Bakterien darstellen, da diese Mikroben „unbakterielle“ Eigenschaften, wie z. B. das Vorhandensein von N-gebundenen Glykoproteinen oder ein unspezifisches Spektrum an Antibiotikasensitivität aufwiesen. Bei einer großangelegten Analyse der tRNAs einzelner Spezies durch Woese wurde dann aufgezeigt, dass diese besonderen „Bakterien“ evolutionär weder Bakterien, noch Eukaryoten glichen, sondern phylogenetisch „zwischen“ diesen standen. Woese nannte sie daher 1977 *Archae*-Bakterien, oder kurz einfach *Archaeen*.^[122]

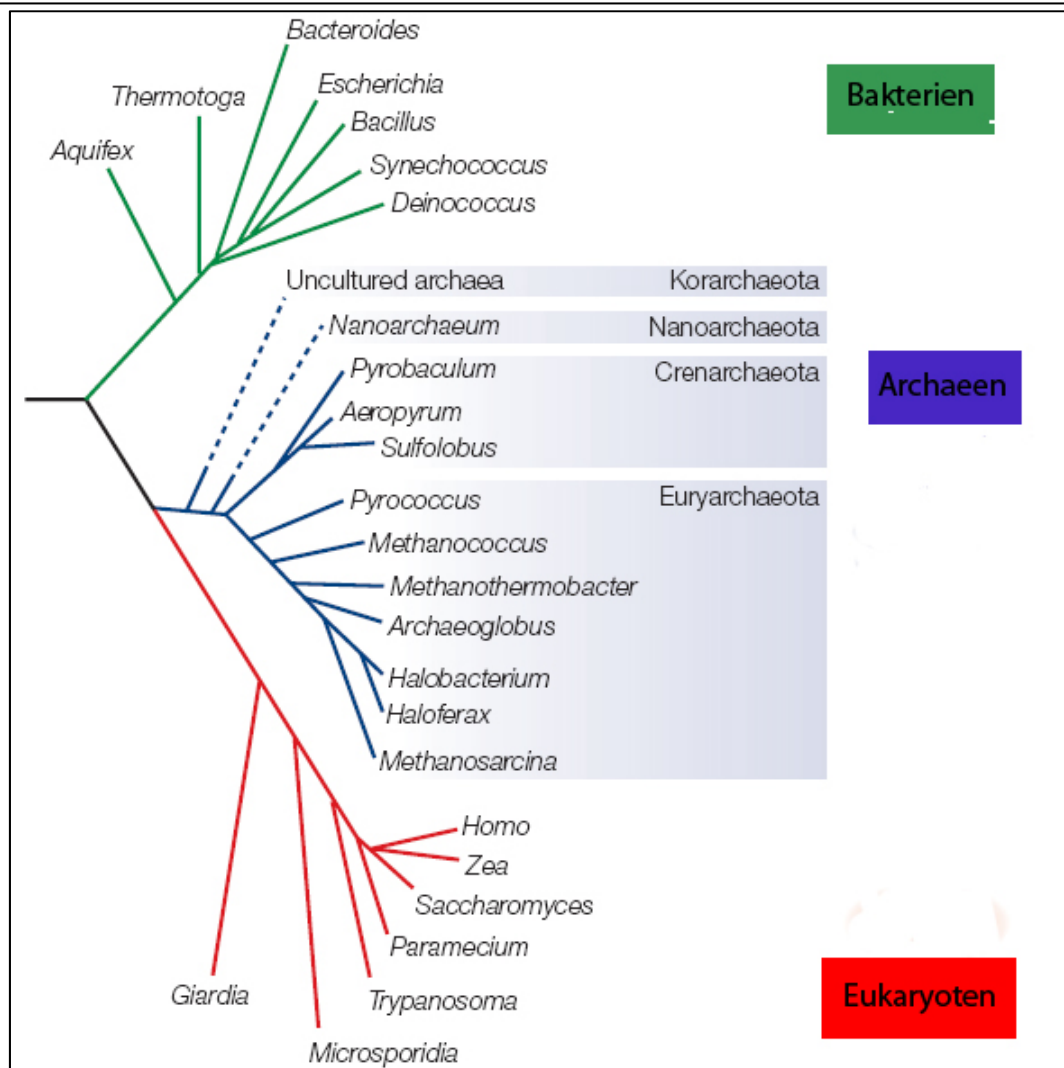


Abbildung 23: Phylogenetischer Stammbaum (modifiziert nach Allers *et al.*^[123]).

Die metabolischen Funktionen von *Archaeen* ähneln daher denen von Bakterien, wohingegen die Funktionen der Informationsweiterleitung denen der Eukaryoten ähnlich sind. Eine wichtige Eigenschaft der *Archaeen* ist, dass sie in rauen und unüblichen Umgebungen wachsen und leben können.^[123] Sie werden in fünf physiologische (halophil, thermophil und acidophil) und metabolische (Nitrifizierer und methanogen) Gruppen eingeteilt. Eine weitere später hinzugefügte Gruppe ist die der anaeroben Methanoxidierer.^[124-127] Die extremen Halophile wachsen und leben in Umgebungen mit Salzkonzentrationen höher als 150 – 200 g/L. Da Natrium bei hohen intrazellulären Konzentrationen toxisch wirkt, bedingt durch die elektrochemischen und osmotischen Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren und Proteinen, begegnen Halophile dieser chronischen energetischen Herausforderung, indem sie das Eindringen des Natriumüberschusses in die Zelle verhindern.^[128-130] Die hyperthermophilen *Archaeen* zeichnen sich durch ihr Wachstumsoptimum bei Temperaturen um 80 °C oder höher aus, der derzeitige bekannte Höhepunkt liegt bei

121 °C.^[131] Diese Organismen überleben bei Temperaturen, bei denen sich Zellen dem Limit für strukturelle Integrität nähern.^[132-133] Acidophile *Archaeen* leben dagegen in sauren Umgebungen und es wurden sogar Arten identifiziert, welche bei einem pH-Wert von unter 0 noch wachsen können. Oftmals leben diese Bakterien nicht nur in sauren Umgebungen, sondern auch bei hohen Temperaturen. Da das Innere der Zelle bei nahezu neutralem pH-Wert gehalten werden muss, müssen diese Organismen oft Protongradienten von bis zu 5 Zehnerpotenzen aushalten.^[134-136] Die Nitrifizierer sind Ammoniak-oxidierende *Archaeen*, die häufig im offenen Ozean oder Erdboden vorkommen und dort wichtige Funktionen übernehmen.^[137-139] Ihre Habitate sind Oberflächensedimente, die eine geringe Konzentration an O₂ aufweisen. Die methanogenen *Archaeen* sind eine Gruppe von anaeroben Organismen, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, Methan als katabolisches Endprodukt zu produzieren. Sie wachsen und leben bei einer Bandbreite von Temperaturen, Salzgehalten und pH-Werten.^[140] Die letzte Gruppe wird gebildet von den Methanoxidierer. Es gibt drei oder mehr phylogenetische Gruppen, die mit den methanogenen *Archaeen* verwandt sind.^[124, 127, 141]

Neuere Studien belegen, dass die *Archaeen* weit stärker verbreitet sind als ursprünglich angenommen wurde.^[142] Trotzdem ist das Wissen über diese Arten im Vergleich zu den „klassischen“ Bakterien und Eukaryoten bisher noch sehr limitiert, unter anderem deshalb, weil viele klassische Methoden der biologischen Forschung mit den extremen Lebensbedingungen der *Archaeen* nicht kompatibel sind. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, Aktivitätsbasierte Sonden, welche für diese Spezies eingesetzt werden können, zu entwickeln (siehe hierzu auch Abschnitt 2., Zielsetzung der Arbeit)

1.5 Naturstoffe als Ausgangsstrukturen zur Entwicklung von Chemotherapeutika und chemischen Sonden

Seit Beginn der Medizin wurden chemische Verbindungen, welche aus Tieren, Pflanzen und Mikroben isoliert wurden, als therapeutische Agenzien eingesetzt. So stammen heute ungefähr 40% der verwendeten Medikamente mehr oder wenig direkt aus biologischen Quellen.^[143-144] Dabei unterscheidet man zwischen Chemotherapeutika, die direkt (d. h. chemisch unmodifiziert) auf Naturstoffe

zurückgehen, und solchen Verbindungen, die semisynthetische Naturstoffanaloge darstellen. Die letzte Gruppe sind synthetisch-hergestellte Verbindungen, die indirekt auf Naturstoffe zurückgeführt werden können, indem deren Naturstoffpharmakophore in den Wirkstoff integriert wurden.

Des Weiteren lassen sich Naturstoffe in zwei Klassen unterteilen: Auf der einen Seite hat die Natur eine Vielzahl von Naturstoffen hervorgebracht, welche nicht-kovalent (d.h. in der Regel reversibel) mit ihren Zielproteinen interagieren. In der zweiten Klasse finden sich solche Verbindungen, welche durch kovalente Bindungen (und somit meistens irreversibel) mit ihren Zielprotein interagieren. Diese „bioreaktiven“ Naturstoffe besitzen dabei meist eine hochreaktive, elektrophile Gruppe, wie z.B. eine Epoxideinheit. oder ein Michael-System.^[145] Beide Naturstoffklassen sind dabei für biomedizinische Anwendungen von Interesse. Währenddessen die nicht-reversibel-wirkenden Naturstoffe insbesondere bei der Entwicklung von Chemotherapeutika im Focus stehen, stellen bioreaktive Naturstoffe interessante Ausgangsverbindungen für die Darstellung chemischer Werkzeuge, z. B. für chemische Proteomik-Anwendungen, dar.^[146]

Das Interesse an den naturstoffbasierten Wirkstoffen erlebte einen Einbruch in 1980ern und 1990er Jahren, hervorgerufen durch die Einführung der kombinatorischen Chemie, die mit „High-Throughput-Screens“ (HTS) gekoppelt wurde. Allerdings stellte sich später heraus, dass mit dieser Methode nur wenige potenzielle Wirkstoffkandidaten gefunden werden, wodurch das Interesse an den Naturstoffen wiederbelebt wurde.^[147] So werden Naturstoffe heute als privilegierte Molekülgerüste angesehen, da sie mittels der Evolution so in ihrer Struktur „entwickelt“ wurden, um effizient mit biologischen Makromolekülen, speziell Proteinen, zu interagieren. Dementsprechend zeigte sich in HTS-Kampagnen, dass naturstoffbasierte small molecule-Substanzbibliotheken höhere Trefferraten als „synthetische“ Substanz-Bibliotheken erreichen.^[148] Die direkte Verwendung von Naturstoffen z. B. als Therapeutika oder chemische Werkzeuge birgt jedoch aufgrund ihrer komplexen Struktur einige Herausforderungen.^[149] So stellt die Bereitstellung von ausreichendem Material, welches normalerweise durch Isolation oder synthetische Methoden gewonnen wird, für eine volle Charakterisierung der biologischen und chemischen Eigenschaften bzw. eine spätere chemotherapeutische Anwendung häufig eine große Herausforderung dar. Des Weiteren ist die Erforschung der molekularen Zielstruktur des Naturstoffes oft zeitraubend und

arbeitsintensiv. Zwar haben die Fortschritte in der Targetidentifizierung (z. B. mittels affinitätsbasierten Chromatographiemethoden, Proteomik oder Hefe-3-Hybrid-Systemen) und der chemischen Synthese die Identifizierung der Zielmoleküle vereinfacht.^[150-151] Die meisten dieser Methoden benötigen allerdings eine Derivatisierung der Leitstruktur, um eine kovalente Bindung von Naturstoff zum Zielmolekül oder die Modifikation des Naturstoffs mit einem Reporter, wie Biotin oder einem Fluorophor, zu ermöglichen. Idealerweise sollte der Naturstoff an einer für die Aktivität nicht relevanten Stelle funktionalisiert werden, und somit ein Derivat erzeugen, dessen Aktivitätsmuster dem des Naturstoffes ähnelt. In der Realität erfordert dies aber häufig die Totalsynthese des Naturstoffes, indessen Zuge die Modifikation eingebaut wird.^[146] Dies verdeutlicht, dass Naturstoffe zwar interessante Ausgangsstrukturen für die Entwicklung chemischer Sonden darstellen; deren systematische Anwendung, z. B. als chemische Sonden, ist jedoch noch immer mit großen Schwierigkeiten verbunden und erfordert aufwendige, chemisch-biologische Studien.

2. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war die Entwicklung neuer chemischer Sonden zur Anwendung in der chemischen Proteomik. Hierzu sollten zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden:

In dem ersten Ansatz sollte eine neue chemische Sonde auf der Basis eines Naturstoffes entwickelt werden. Als „Blaupause“ für die Entwicklung sollte der Naturstoff Callysponginsäure (**1**, Abb. 24) dienen.

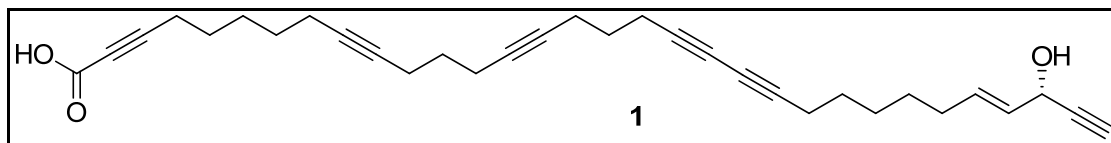


Abbildung 24: Struktur der Callysponginsäure (**1**).

Callysponginsäure (**1**) gehört zur Naturstoffklasse der Polyacetylene, einer Naturstoffklasse mit vielfältigen biologischen Aktivitäten, die von cytotoxischen zu antiviralen, antifungalen oder antibakteriellen Eigenschaften reichen.^[152-162]

Callysponginsäure (**1**) wurde im Jahre 2002 aus dem schwach violetten japanischen Schwamm *Callyspongia truncata* isoliert.^[163] Interessanterweise hat sich *Callyspongia truncata* als eine reiche Quelle zur Isolierung von Polyacetylenen mit einer Vielzahl von biologischen Aktivitäten, wie Fäulnisverhütung,^[164] Induzierung der Raupenmetamorphose und Inhibierung der Befruchtung hervorgegestellt.^[164-165] Für Callysponginsäure (**1**) konnte eine Inhibierung von α -Glucosidasen mit einem IC₅₀ von 0.25 $\mu\text{g/mL}$ nachgewiesen werden, aber es konnte keine Aktivität gegenüber β -Glucosidasen, β -Galaktosidasen, Thrombin und Trypsin bei 100 $\mu\text{g/mL}$ festgestellt werden. Erste Struktur-Wirkungsstudien legten dabei nahe, dass sowohl die Carbonsäure als auch die Allylalkoholeinheit für die beobachtete Aktivität der Callysponginsäure (**1**) verantwortlich sind.^[163] Weitergehende Studien, insbesondere bzgl. weitergehender biologischer Aktivitäten wurden bisher jedoch noch nicht mit dieser Substanz durchgeführt.

Dieser Naturstoff ist für chemische Proteomik-Anwendungen interessant, da er strukturell Verwandtschaft mit einer Fettsäure zeigt und terminal über eine Alkylgruppe, welche für 2-Stufen-ABPP verwendet werden kann, verfügt. In vorherigen Studien, z. B. von der Gruppe Ploegh, konnte gezeigt werden, dass terminal-markierte Fettsäuren zur Markierung von Lipidmodifikationen von Proteinen

verwendet werden können.^[166-167] In Analogie könnte Callysponginsäure (**1**) daher auch zur posttranslationalen Lipidmodifikation von Proteinen beitragen. Aufgrund der zur Carbonsäure in Konjugation vorhandene Alkyngruppierung würde dann aber ein bioreaktives Michael-System entstehen, welches mit einer Vielzahl von Enzymen reagieren könnte. Diese chemisch-biologischen Überlegungen legen nahe, dass Callysponginsäure (**1**) womöglich weitreichendere Bioaktivitäten aufzeigt, als bisher in der Literatur beschrieben wurde,^[163] und daher eine nützliche chemische Sonde, z. B. darstellen könnte.

Aus diesem Grund sollte die Verwendbarkeit von Callysponginsäure (**1**) im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Eine Synthese von Callysponginsäure (**1**) ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Deshalb sollte zuerst eine enantioselektive, chemische Synthese zu diesem Naturstoff entwickelt werden. Dann sollte untersucht werden, inwiefern der Naturstoff zur Markierung von Proteinen und somit für chemische Proteomik-Experimente eingesetzt werden kann. In einem letzten Schritt sollten die markierten Proteine dann identifiziert werden, um eine vollständige Charakterisierung der Sonde zu ermöglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte dann durch gezielte chemische Synthese chemischer Sonden die Anwendbarkeit von ABPP erweitert werden. ABPP ist mittlerweile eine etablierte chemisch-biologische Methode und die Sonde FP hat sich in vielfältigen Anwendungen zum Profiling von Serinhydrolasen bewährt. Für einige Anwendungen sind jedoch Alternativsonden wünschenswert. So konnte FP zwar in Profiling-Experimenten von Pflanzen verwendet werden, aufgrund der hohen Reaktivität von FP wurde bei diesen Experimenten jedoch eine Vielzahl von Proteinen markiert, wodurch eine Gel-basierte Analyse von Enzymaktivitäten von pflanzlichen SHs, insbesondere von Carboxylesterasen, nicht mehr möglich ist.^[168] Deshalb sollte eine spezifischere Sonde für diese Zielproteine entwickelt werden.

Des Weiteren sollten Sonden für SHs in thermophilen *Archaea*-Bakterien entwickelt werden. Dies ist notwendig, da die hohe Reaktivität von FP zwar eine hohe Markierungsrate bewirkt, als Nebeneffekt jedoch mit einer geringen Stabilität in Wasser, insbesondere bei höheren Temperaturen, einhergeht. Um nun *in vivo*-ABPP-Experimente in thermophilen *Archaeen* durchführen zu können, sollten daher im Rahmen dieser Arbeit „stabilere“ Phosphonatanaloga für ABPP entwickelt werden.

Um diese Ziele zu verwirklichen, sollten daher die folgenden Schritte durchgeführt werden: Zuerst sollte ein PEG-basiertes FP-Analogon synthetisiert werden, um für spätere Markierungs-Vergleichsexperimente über eine interne „Richtschnur“ zu verfügen. Im Gegensatz zu dem herkömmlichen FP, welcher über einen Alkyllinker verfügt, sollte dieses Derivat FP-PEG (Abb. 25, **2**) über einen kurzen PEG-Linker verfügen, da dieses Derivat über eine bessere Wasserlöslichkeit als FP verfügen sollte.

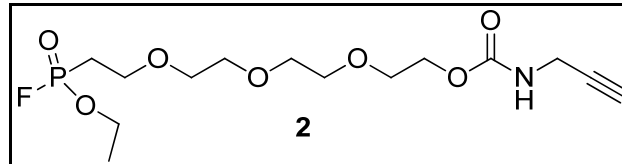


Abbildung 25: Struktur der Fluorophosphonatsonde **2**.

Dann sollte – ausgehend von den Ergebnissen der Kristallstruktur von AeCXE1 (*Actinidia eriantha*) mit dem hochaffinen Inhibitor Paraoxon - eine spezifischere Sonde für Carboxylesterasen in Pflanzen entwickelt werden. Daher sollte ein Nitrophenolderivat (Abb. 26, **3**) synthetisiert werden, in welchem eine der Ethylgruppen durch den PEG-Alkinlinker ersetzt wurde, da in der Kristallstruktur eine Ethylgruppe aus der Bindungstasche herausragte und sich somit als Modifikationsstelle zur Anbringung eines Reporters anbieten sollte.^[112] Neben der Alkinsonde sollte dabei auch eine bereits trifunktional-modifizierte Nitrophenolsonde (Abb. 26, **4**) dargestellt werden. Nach erfolgreicher Synthese sollten die Sonden dann chemisch-biologisch bzgl. ihrer Anwendbarkeit in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* evaluiert werden.

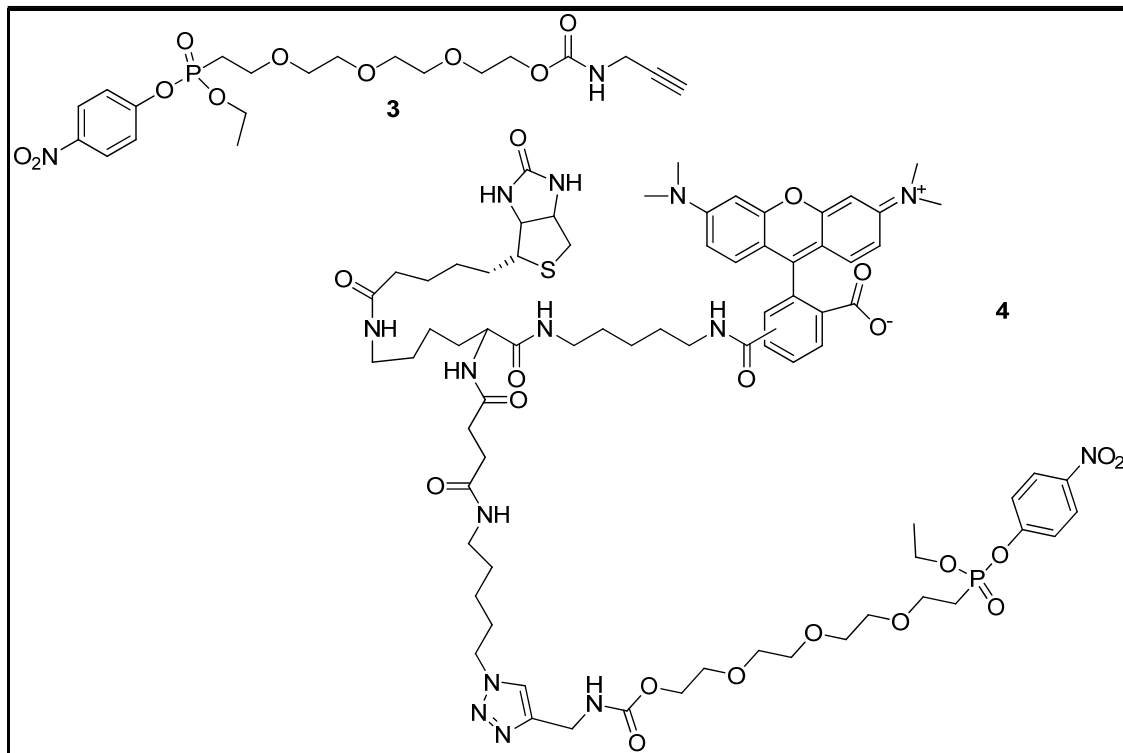


Abbildung 26: Zielstrukturen der geplanten Nitrophenol-basierten Sonden **3** (mit Alkin-Reporter) und **4** (mit Rhodamin- und Biotin-Reporter). Diese sollten zum Profiling von Carboxylesterasen in *Arabidopsis thaliana* verwendet werden.

Zur Anwendung in *Archaeen* sollten dann Nitrophenolderivate synthetisiert werden, in welchen die Ethylgruppe am Phosphonat durch chemisch-diverse Gruppierungen ersetzt werden sollte. Diese Derivate sollten anschließend wiederum in biologischen Tests auf ihre Anwendbarkeit getestet werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung einer Sonde auf der Basis von Callysponginsäure (1)

3.1.1 Retrosynthese zur Darstellung von Callysponginsäure (1)

Der lineare Naturstoff Callysponginsäure (Abb. 27, **1**) verfügt an dem einen Ende (in Abb. 27 rechtes Ende) über eine terminale Alkingruppierung, an welche sich ein Allylalkohol anschließt. Das andere Ende wird durch eine Carbonsäure, welche mit einer Alkingruppierung in Konjugation steht, gebildet (in Abb. 27, linkes Ende). Neben zwei weiteren internen Dreifachbindungen verfügt Callysponginsäure (**1**) noch über zwei in Konjugation stehende Alkinverbindungen, so dass sich insgesamt sechs Alkinverbindungen im Naturstoff finden. Benachbarte Alkine lassen sich durch eine Cadiot-Chodkiewicz-Reaktion darstellen. Da eine Trennung des Moleküls an dieser Stelle auch zu zwei Fragmenten mit vergleichbarer Komplexität führt, wurde der erste Schnitt an dieser Stelle durchgeführt.

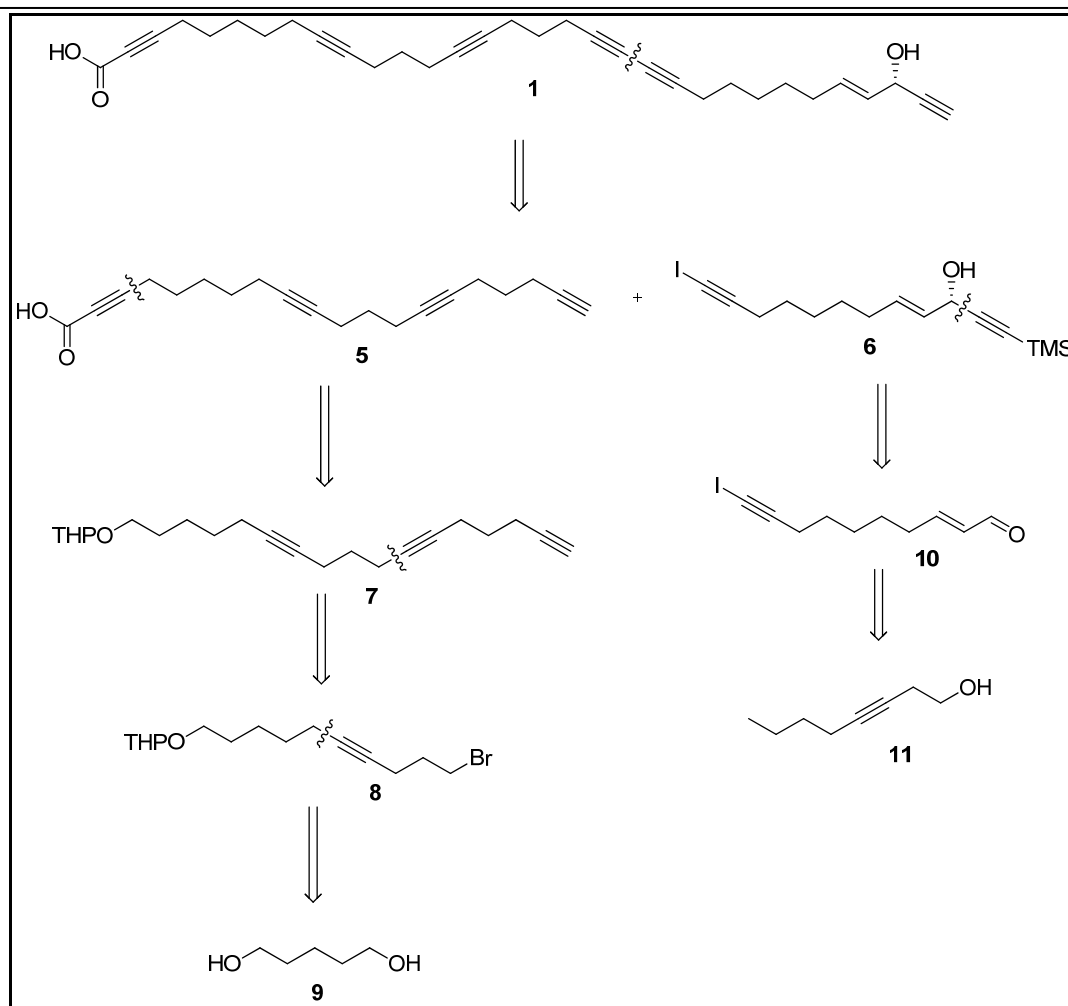


Abbildung 27: Retrosynthese zur Darstellung des Naturstoffes Callysponginsäure (1).

Als weitere mögliche Schnittpunkte der erhaltenen Fragmente boten sich die Alkin-Alkylbindungen an, da diese sich mittels nukleophiler Substitution aus Alkylhalogeniden und deprotonierten Alkinen darstellen lassen. Das Stereozentrum am Alkohol lässt sich durch eine stereoselektive Addition eines Alkins an einen α,β -ungesättigten Aldehyd etablieren; aus der Vielzahl möglicher Methoden hierzu sollte ein von Trost entwickeltes Verfahren angewendet werden.^[169] Das benötigte Iodalkin lässt sich aus einem terminalen Alkin, welches wiederum durch basisch-katalysierte Alkinisomerisierung erhalten werden kann, darstellen, so dass die retrosynthetischen Überlegungen zu 1,5-Pentandiol (**9**) und 3-Octin-1-ol (**11**), als kleinste und kommerziell erhältliche Ausgangsmaterialien führten. Dabei müssen bei der Synthese des ersten Bausteines (= linke Seite, Abb. 27) mehrere kettenverlängernde Kupplungen durchgeführt werden, gefolgt von einer anschließenden Anbringung einer Säurefunktion. Im zweiten Baustein werden verschiedene Redox- und Kupplungsreaktionen benötigt, um zum gewünschten Ausgangsmaterial für die finale Cadiot-Chodkiewicz-Reaktion zu gelangen.

3.1.2 Synthese des 1. Bausteins (linkes Fragment)

Die Synthese des 1. Bausteins startete von 1,5-Pentandiol (**9**), welches durch verschiedene Kettenverlängerungsschritte in die Verbindung **5** überführt wurde (zur Übersicht über die Schritte, siehe Abb. 28).

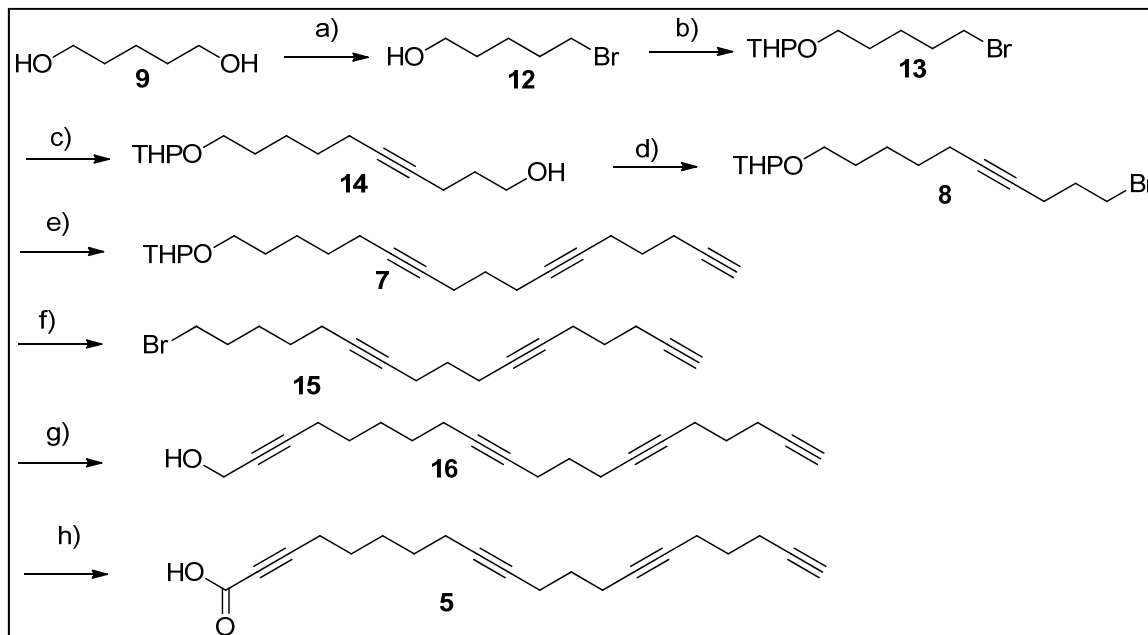


Abbildung 28: Syntheseübersicht 1. Baustein; a) HBr, Toluol, Rückfluss, 12 h, 85%; b) DHP, HCl, DCM, RT, 4 h, 93%; c) 4-Pentin-1-ol (**17**), *n*-BuLi, HMPA, THF, 0°C zu RT, 12 h, 94%; d) NBS, PPh₃, DMF, 0°C, 2 h, 91%; e) 1,6-Heptadiin (**18**), *n*-BuLi, HMPA, THF, 0°C zu RT, 12 h, 71%; f) Br₂, PPh₃, DCM, RT, 30 min, 92%; g) 2-Propin-1-ol (**19**), *n*-BuLi, HMPA, THF, 0°C, 12 h, 48%; h) CrO₃, H₂SO₄, H₂O, Aceton, 0°C, 1h, 92%.

Dabei wurden bei den kettenverlängernden Reaktionen im Wesentlichen auf nucleophile Substitutionen eines Alkylhalogenids durch deprotonierte Alkine zurückgegriffen. Nach Erreichen der gewünschten Kettenlänge wurde die Alkoholfunktion von **16** dann in die benötigte Säurefunktion mittels einer Oxidation überführt. Die einzelnen Schritte sollen im Folgenden genauer behandelt werden.

3.1.2.1 Monobromierung des Ausgangsmaterials 1,5-Pentandiol (**9**) und Schützen der verbleibenden Alkoholfunktion

Da bei der Synthese des 1. Bausteins hauptsächlich kettenverlängernde Reaktionsschritte verwendet wurden, bei denen Alkylhalogenide mit deprotonierten Alkinen umgesetzt wurden, wurde das Diol **9** im ersten Schritt an einem der beiden Hydroxylgruppen mit einer THP-Schutzgruppe geschützt, bevor die zweite Hydroxylgruppe dann in ein Bromid überführt wurde (Abb. 29).

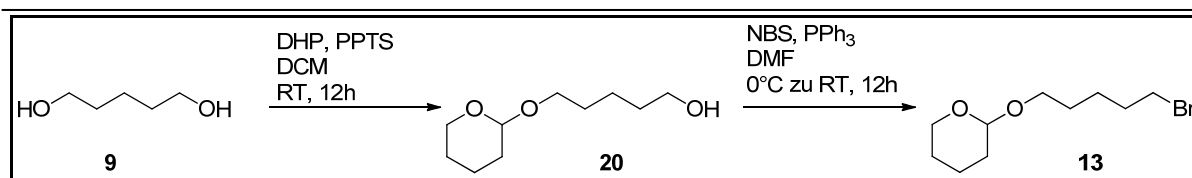


Abbildung 29: Einführung einer THP-Schutzgruppe an einer Hydroxylgruppe und anschließende Überführung der zweiten Hydroxylgruppe in ein Bromid ergeben Intermediat **13**.

Die Einführung der THP-Schutzgruppe mit DHP und PPTS als Katalysator in DCM als ersten Schritt wurde analog zu der Vorschrift von Miyashita *et al.* durchgeführt,^[170] allerdings wurde die Reaktionszeit bei der vorliegenden Reaktion auf 12h erhöht. Bei dieser Reaktionsführung konnte das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 58% erhalten werden. Ein erster Bromierungsversuch mit den Reagenzien CBr₄ und PPh₃ in DCM verblieb jedoch ohne Erfolg; allerdings konnte mit NBS und PPh₃ in DMF nach den Reaktionsbedingungen von Bates *et al.* das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 70% erhalten werden.^[171] Dazu wurde das THP-geschützte Edukt (**20**) zusammen mit PPh₃ in DMF gelöst, bevor das Bromierungsreagenz NBS zugegeben wurde. Zur Beendigung der Reaktion erfolgte die Zugabe von MeOH, wodurch sich jedoch auch das ausgefallene Nebenprodukt Triphenylphosphoroxid wieder löste, so dass sich die Reaktion als insgesamt sehr aufwendig bei der Aufreinigung herausstellte. Da des Weiteren die Ausbeute des ersten Schrittes, d. h. der Schützung der Hydroxylgruppe, nicht zufriedenstellend war, wurde nach einem alternativen Ansatz gesucht. Deshalb wurde eine selektive Monobromierung von 1,5-Pentandiol (**9**) versucht. Die dazu benötigte Reaktion wurde analog zur veröffentlichten Synthese von Chong *et al.* durchgeführt.^[172]

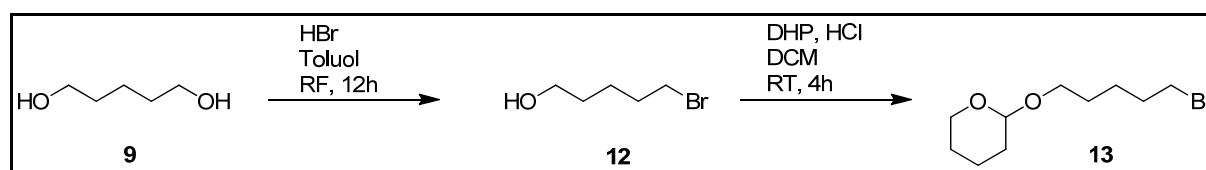


Abbildung 30: Bromierung und anschließendes THP-Schützen von 1,5-Pentandiol (**9**).

Dazu wurde 1,5-Pentandiol (**9**) in Toluol gelöst und mit 48%iger aq. HBr-Lösung versetzt (Abb. 30). Die Reaktion wurde zum Rückfluss erhitzt und über Nacht gerührt, so dass nach dem Aufarbeiten eine Ausbeute von 85% erzielt werden konnte. Die Einführung der THP-Schutzgruppe am verbleibenden freien Alkohol konnte dann analog der Vorschrift von Müller *et al.* in 93% Ausbeute durchgeführt werden.^[173] Im Gegensatz zu dem bei diesem Reaktionstyp normalerweise verwendeten PPTS wird bei dieser Methode aq. HCl als Katalysator eingesetzt und eine Reaktionszeit von 4h eingehalten. Diese Reaktionsführung erlaubt einen nahezu

vollständigen Umsatz, so dass die Darstellung des Intermediates **13** in insgesamt sehr guten Ausbeuten möglich wurde.

3.1.2.2 Umsetzung von Intermediat **13** mit 4-Pentin-1-ol (**17**)

Bei dem ersten Kupplungsversuch mit 4-Pentin-1-ol (**17**) wurde zuerst ein geschütztes 4-Pentin-1-ol-Derivat eingesetzt, da angenommen wurde, dass die freie Alkoholfunktion zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnte. Deshalb wurde die Hydroxylgruppe zuerst als ein Silylether geschützt.

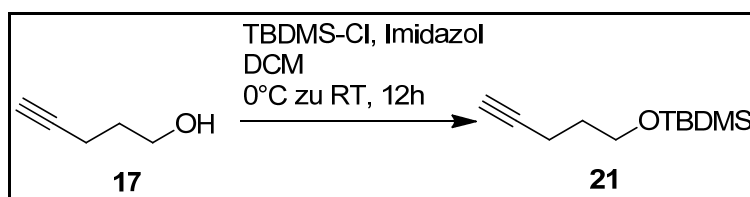


Abbildung 31: Einführung einer TBDMS-Schutzgruppe an **17**.

Als Silylschutzgruppe wurde die Trimethyl-*tert*-butylsilyl-Schutzgruppe ausgewählt und die Reaktion analog zu der Vorschrift von Guo *et al.* durchgeführt.^[174] Hierzu wurde 4-Pentin-1-ol (**17**) zusammen mit Imidazol in DCM gelöst und anschließend das ebenfalls in DCM gelöste TBDMSCl bei 0°C zugegeben. Das gewünschte Produkt **21** konnte dann in 80% Ausbeute erhalten werden. Dieses Intermediat **21** wurde dann mit **13** analog zur Vorschrift von Kulkarni *et al.* umgesetzt.^[175]

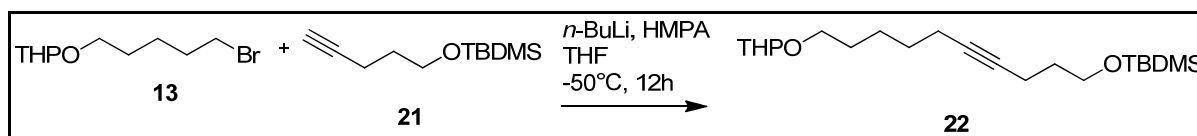
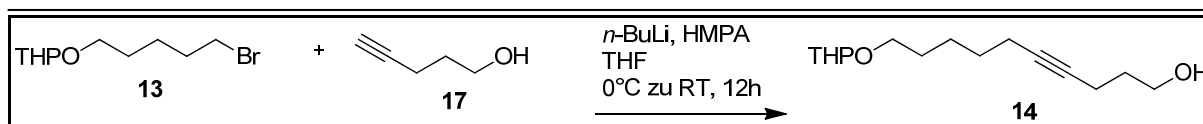


Abbildung 32: Kupplung von **13** und **21**.

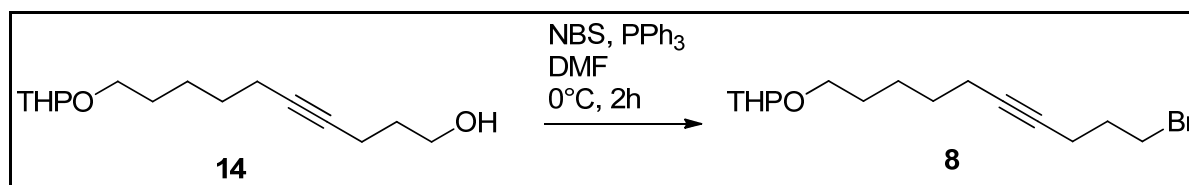
Dazu wurde die endständige Dreifachbindung mit *n*-BuLi in THF und HMPA zuvor deprotoniert und die Lösung aus **13** in THF anschließend langsam zugegeben. Die Deprotonierung wurde bei -70°C für 30 min durchgeführt, die eigentliche Kupplungsreaktion jedoch bei -50°C in einer über Nacht-Reaktion. Bei dieser Reaktionsführung konnte das Produkt **22** jedoch nur in Ausbeuten von 34% erhalten werden. Deshalb wurde in einem zweiten Ansatz die gleiche Reaktion ohne TBDMS-Schutzgruppe an 4-Pentin-1-ol (**17**) durchgeführt (Abb. 33).

Abbildung 33: Kupplung von **13** und **17**.

Bei diesem Ansatz wurde die Reaktion diesmal bei 0°C durchgeführt, wobei auch hier zuvor die Deprotonierung des Alkins bei einer etwas niedrigeren Temperatur (-15°C) durchgeführt wurde. Als Co-Solvens wurde HMPA verwendet, analog der Vorschrift von Abad *et al.*,^[176] wobei jedoch die Menge an *n*-BuLi verdoppelt, die Menge an HMPA jedoch etwas erniedrigt wurde. Die Reaktion lieferte dann das Produkt **14** in einer sehr guten Ausbeute von 94%. Versuche, das toxische HMPA durch das weniger toxische DMPU zu ersetzen, waren jedoch leider nicht erfolgreich, so dass auch in späteren Reaktionen auf HMPA als Co-Solvens zurückgegriffen wurde.

3.1.2.3 Bromierung von **14**

Um eine weitere kettenverlängernde Kupplung durchführen zu können, musste im nächsten Schritt die freie Alkoholfunktion von **14** in ein Bromid überführt werden (Abb. 34).

Abbildung 34: Überführung der Hydroxylgruppe von **14** in ein Bromid führt zu Intermediat **8**.

Dazu wurde **14** in DMF gelöst, NBS und PPh₃ zugefügt und die Reaktion analog der Vorschrift von Abad *et al.* durchgeführt.^[176] Die DC-Kontrolle ergab einen fast vollständigen Umsatz des Eduktes nach 2h, so dass zur Aufarbeitung der Reaktion MeOH zugegeben wurde. Nach Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt **8** dann in 91% Ausbeute erhalten werden.

3.1.2.4 Kupplung von Intermediat **8** mit 1,6-Heptadiin (**18**)

Da 1,6-Heptadiin (**18**) ein bifunktionales Alkinderivat ist, wurde zuerst eine der beiden endständigen Dreifachbindungen mit einer Silylschutzgruppe geschützt.



Abbildung 35: Einführung der TMS-Schutzgruppe an **18**.

Hierzu wurde eine Reaktion analog der Vorschrift von Chang *et al.* durchgeführt.^[177] Nach dieser Vorschrift wurde 1,6-Heptadiin (**18**) zunächst bei -78°C für 1 h mit LHMDs gerührt, um eine vollständige Deprotonierung der Alkingruppe zu gewährleisten, gefolgt von der Zugabe von TMS-Cl bei -78°C. Nach 2 h wurde die Reaktion mit ges. NH₄Cl-Lösung gequencht und aufgereinigt. Das Produkt **23** konnte in einer Ausbeute von 81% erhalten werden, so dass die nachfolgende Kupplungsreaktion wiederum analog zur Vorschrift von Abad *et al.* durchgeführt werden konnte (Abb. 36).^[176]

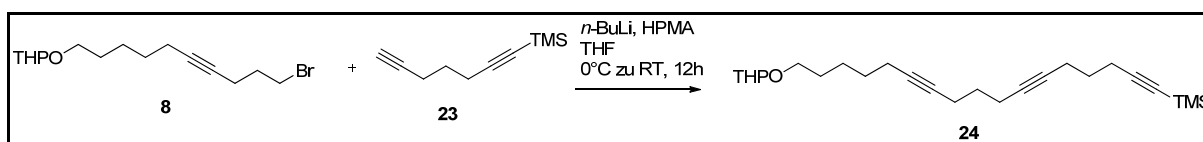


Abbildung 36: Kupplung von **8** und **23** nach den Reaktionsbedingungen von Abad *et al.*.^[176]

Obwohl die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der vorherigen Kupplungsreaktion verwendet wurden, konnte das gewünschte Produkt **24** mit einer maximalen Ausbeute von 30% erhalten werden. Auch Veränderungen der Reaktionsbedingungen führten zu keinem positiven Ergebnis, sodass auch hier zu einer Variante ohne Schutzgruppe gewechselt wurde (Abb. 37).

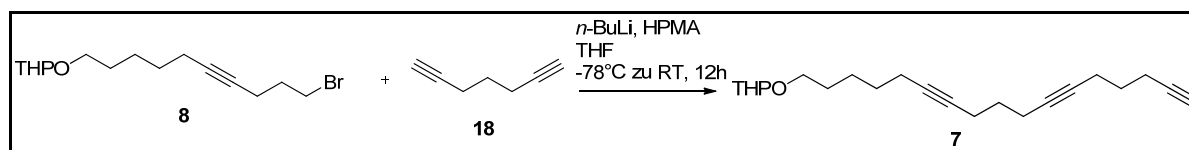


Abbildung 37: Kupplung von 8 und 18.

Dabei wurde die Kupplungsreaktion bei -78°C analog zu der Vorschrift von Schelper *et al.* durchgeführt.^[178] Dementsprechend wurde zuerst 1,6-Heptadiyn (**18**) mit *n*-BuLi in THF und HMPA deprotoniert, bevor eine Lösung aus **8** in THF zugetropft wurde. Die erhaltene Mischung wurde über Nacht gerührt, wobei sie sich auf RT erwärmen konnte. Bei dieser Reaktionsführung konnte das Produkt **7** erfreulicherweise in 71% Ausbeute erhalten werden. Interessanterweise konnten – trotz der vorherigen Befürchtung – auch keine „Doppelkupplungen“ beobachtet werden.

3.1.2.5 Entfernung der THP-Schutzgruppe

Nachdem die benötigte endständige Dreifachbindung nun eingeführt wurde, sollte jetzt die Einführung der Säure vorbereitet werden. Dazu sollte im nächsten Schritt die THP-Schutzgruppe wieder entfernt werden (Abb. 38).

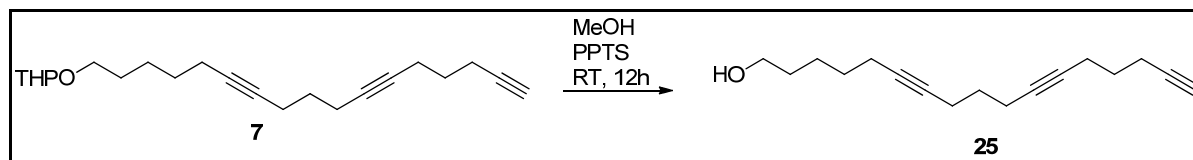


Abbildung 38: Entfernen der THP-Schutzgruppe von **7**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Slowinski *et al.* durchgeführt,^[179] so dass PPTS nur in katalytischen Mengen verwendet wurde. Ein vollständiger Umsatz des Eduktes **7** konnte erst nach über 12h beobachtet werden. Nach Aufreinigung des Rohproduktes über eine Kieselgelsäule konnte das Produkt **27** dann in einer Ausbeute von 97% erhalten werden.

3.1.2.6 Modifizierung der freien Alkoholfunktion von **25**

Da sich eine freie Alkoholfunktion nicht zur Kupplung mit Dreifachbindungen eignet, musste diese nun in eine Abgangsgruppe umgewandelt werden. Zuerst sollte dazu die Hydroxylgruppe in einer Tosylgruppe umgewandelt werden (Abb. 39).

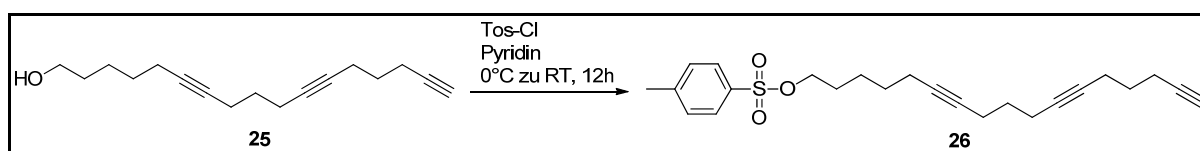


Abbildung 39: Überführung der Hydroxylgruppe von **25** in einer Tosylgruppe.

Die Reaktion wurde - nach einigen Versuchen mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen - analog der Vorschrift von Cryle *et al.* durchgeführt,^[180] wobei die Reaktionszeit jedoch auf über 12h erhöht wurde, da eine DC-Kontrolle erst nach dieser Zeit einen kompletten Umsatz des Eduktes andeutete. Zur Durchführung der Reaktion wurde das Edukt **25** in Pyridin gelöst und Tos-Cl bei 0°C zugegeben, bevor die Reaktionslösung sich auf RT erwärmen konnte. Bei dieser Reaktionsführung konnte das Produkt **26** mit 79% Ausbeute isoliert werden. Zur anschließenden Kupplung mit Propinsäure (**27**) wurde ebenfalls auf die Vorschrift von Cryle *et al.* zurückgegriffen (Abb. 40).^[180]

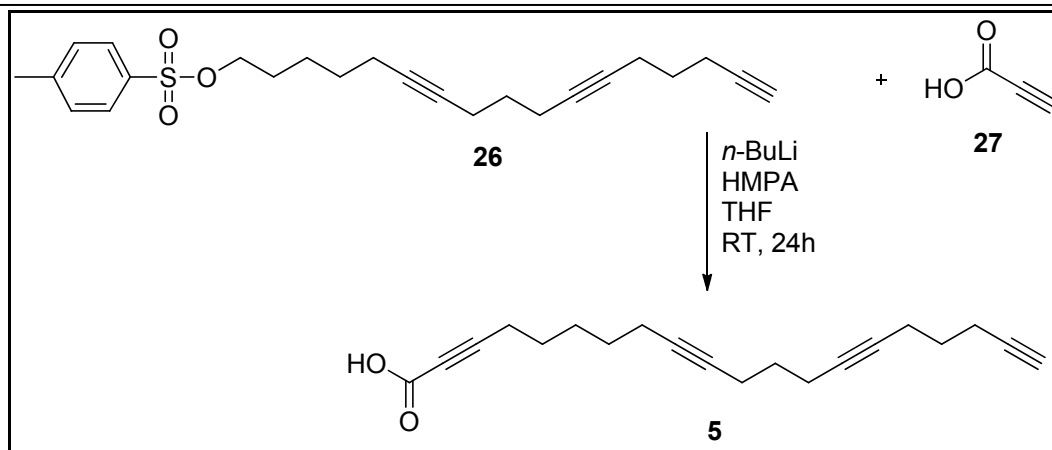


Abbildung 40: Kupplung von **26** und **27** nach der Vorschrift von Cryle *et al.*^[180]

Hierzu wurde die Propinsäure (**27**) zuerst in THF gelöst, dann wurde n -BuLi bei 0°C zugetropft, bevor das in HPMA-gelöste Edukt **26** der Reaktionslösung zugefügt und die entstandene Mischung bei RT über Nacht gerührt wurde. Die Aufarbeitung des Produktes wurde verändert durchgeführt. Leider stellte sich diese Reaktionsführung als äußerst unzuverlässig heraus. Zwar konnte das Produkt **5** in einem Ansatz einmal in 55% Ausbeute isoliert werden, meistens jedoch konnten nur bedeutend geringere Mengen oder sogar kein Produkt erhalten werden. Deshalb wurde in einem nächsten Ansatz versucht, einen *tert*-Butyl-geschützten Säurebaustein zu verwenden, obwohl dieser Baustein auch mit dem n -BuLi-Reagenz reagieren könnte (Abb. 41).

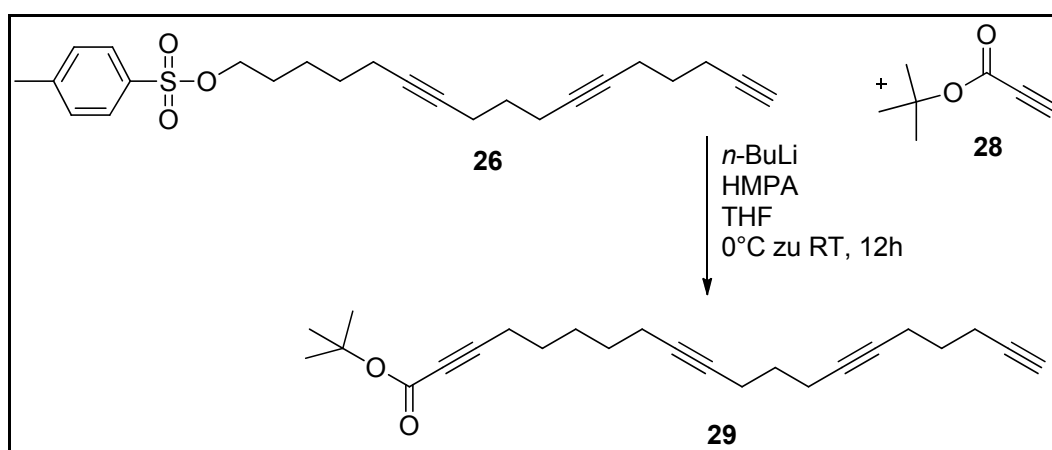


Abbildung 41: Versuchte Kupplung von **26** und **28**.

Bei dieser Reaktionsführung konnte allerdings leicht verunreinigtes Produkt **29** mit einer Ausbeute von 12% isoliert werden; jedoch trat - wie aufgrund der Reaktivität befürchtet - hauptsächlich eine Addition des n -BuLi-Reagenzes an den Ester **28** auf. Da der Erfolg somit auch bei dieser Reaktionsführung ausblieb, musste nach einer anderen Methode zur Einführung der Säurefunktion gesucht werden. Da sich in der

vorangegangenen Syntheseplanung die Kupplung von bromierten Substanzen mit Dreifachbindungen als unkompliziert herausgestellt hat, wurde auch hier als nächstes versucht, eine Kupplung über Alkylbromide zu erreichen. Deshalb wurde zuerst die freie Alkoholfunktion von **25** in ein Bromid überführt (Abb. 42).

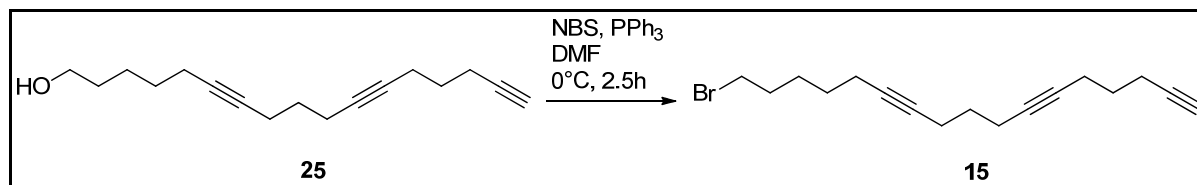


Abbildung 42: Überführung der Hydroxylgruppe von **25** in das Bromid **15**.

Die Reaktion wurde analog zur oben beschriebenen Reaktion durchgeführt,^[176] nur die Reaktionszeit wurde nach DC-Kontrolle auf 2.5 h erhöht. Allerdings konnte das gewünschte Produkt **15** nur in 13% Ausbeute erhalten werden. Da Iod im Allgemeinen chemisch-reaktiver als Brom ist, sollte in einem nächsten Versuch die Tosylgruppe gegen ein Iod ausgetauscht werden (Abb. 43).

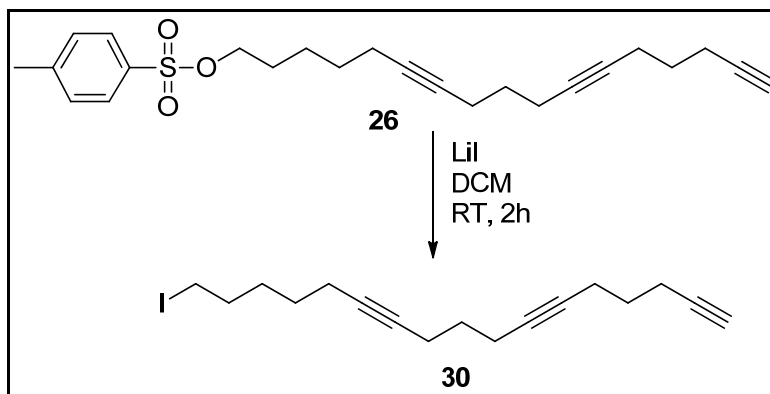
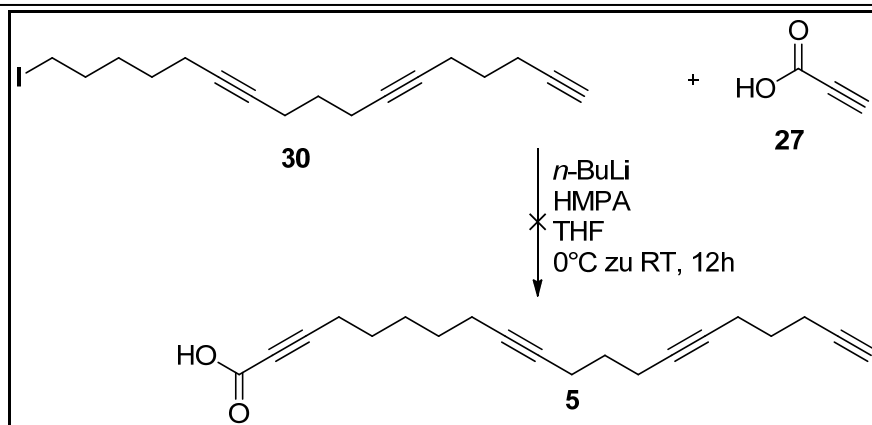
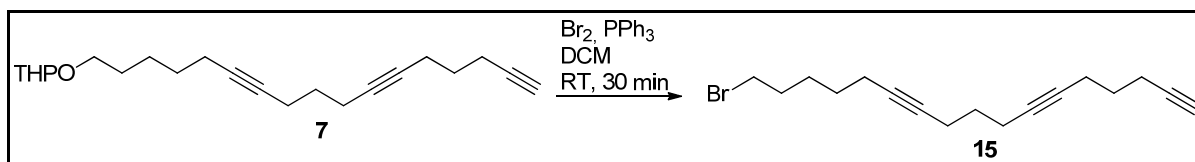


Abbildung 43: Iodierung des Tosylats von **26** führt zum Alkyljodid **30**.

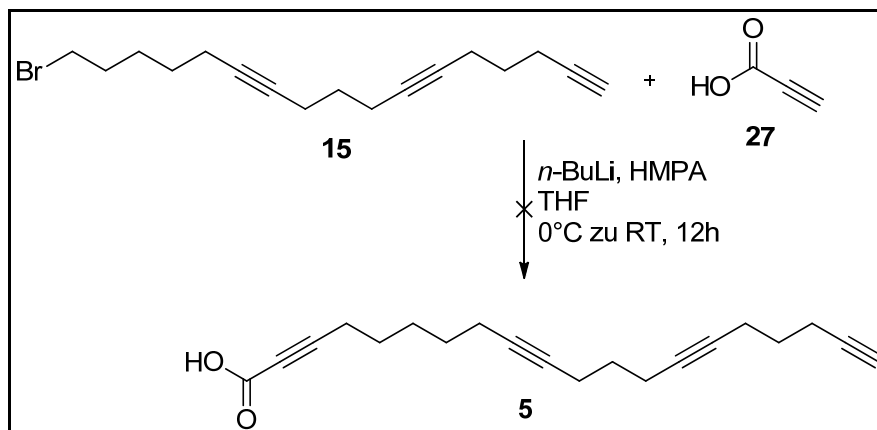
Die Reaktion wurde nach dem Protokoll von Kukovinets *et al.* mit LiI in DCM durchgeführt und der Reaktionsfortschritt via DC kontrolliert.^[181] Dabei wurde gegenüber dem Originalprotokoll die Menge an Iod etwas erhöht und das Lösungsmittel gegen DCM ausgetauscht. Nach 2h konnte kein Edukt mehr identifiziert werden, sodass die Reaktion mit H₂O gequencht und aufgearbeitet wurde. Das gewünschte Produkt **30** wurde in 88% Ausbeute erhalten, so dass erneut die Kupplung mit Propinsäure (**27**) versucht werden konnte (Abb. 44).

Abbildung 44: Einführung der Säure **27**.

Da auch bei dieser Reaktion das gewünschte Produkt **5** nicht isoliert werden konnte, wurde versucht, das Brom auf anderem Wege einzuführen. Dazu wurde von dem THP-geschützten Vorläufer **7** ausgegangen (Abb. 45).

Abbildung 45: Darstellung des Alkylbromids **15**, ausgehend von **7**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Santangelo *et al.* durchgeführt.^[182] Dabei wurde eine Brom-Stammlösung in DCM hergestellt, wodurch die praktische Handhabung mit Brom vereinfacht wurde. Die Stammlösung wurde zusammen mit PPh₃ vorgelegt und anschließend wurde das Edukt **7** tropfenweise zugegeben. Die Reaktion war nach 30 min beendet und konnte aufgearbeitet werden. Das Produkt **15** wurde in einer Ausbeute von 92% erhalten. Anschließend wurde erneut versucht, die Säurefunktion einzuführen, diesmal am Alkylbromid **15** (Abb. 46).

Abbildung 46: Versuch der Einführung der Säure am Alkylbromid **15**.

Hier wurden die gleichen Bedingungen verwendet, wie bei den vorherigen Versuchen,^[176] es konnte aber wiederum kein Produkt isoliert werden. Da alle bisherigen Versuche zur Einführung der Säurefunktion zu keinem Erfolg führten, sollte nun ein Alternativansatz realisiert werden. Hierzu sollte zuerst ein Propargylalkohol eingeführt werden, welcher anschließend zur gewünschten Säure oxidiert werden sollte (Abb. 47).

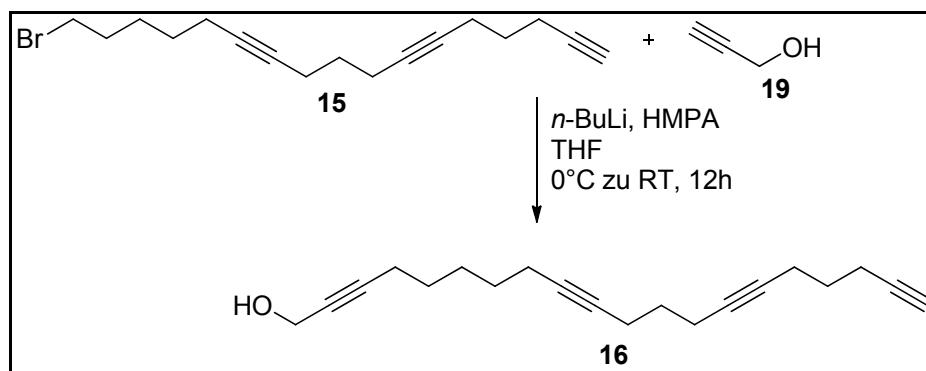


Abbildung 47: Kupplung zu einem Propargylalkohol **16**, ausgehend von **15** und **19**.

Die Kupplungsreaktion wurde analog zur bekannten Vorschrift von Abad *et al.* durchgeführt,^[176] wobei auch hier das 2-Propin-1-ol (**19**) vorher bei -15°C mit $n\text{-BuLi}$ in THF und HMPA deprotoniert wurde. Die Reaktion wurde anschließend bei 0°C und über Nacht gerührt, wobei sich die Reaktion auf RT erwärmen konnte. Nach Aufarbeitung und Reinigung konnte das Produkt **16** mit einer Ausbeute von 48% erhalten werden. Leider konnte auch bei Verwendung alternativer Reaktionsbedingungen keine Ausbeutensteigerung erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde dann eine Jones-Oxidation verwendet, um zur Säurefunktion zu gelangen (Abb. 48).

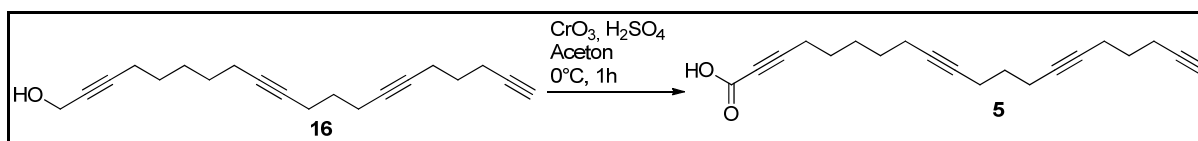


Abbildung 48: Jonesoxidation von **16** zur Säure **5**.

Für die Reaktion wurde eine Chrom-Schwefelsäure-Stammlösung verwendet, die analog zur Vorschrift von Fillion *et al.* hergestellt wurde.^[183] Diese Stammlösung wurde dann bei 0°C zur Reaktionslösung gegeben und nach 1h konnte durch DC-Kontrolle kein Edukt **16** mehr festgestellt werden. Das Produkt **5** konnte ohne weitere Reinigung mit einer Ausbeute von 91% erhalten werden. Somit wurde der erste Baustein erfolgreich synthetisiert.

3.1.3 Synthese des 2. Bausteins

Bei der Synthese des zweiten Bausteins wurde vom 3-Octin-1-ol (**11**) ausgegangen, das im ersten Schritt umgelagert werden musste. Nachfolgend wurden verschiedenen Oxidations-, Reduktions-, und Kupplungsreaktionen durchgeführt, um den gewünschten Baustein zu erhalten. Im letzten Schritt wurde eine stereoselektive Kupplungsreaktion mit einem chiralen Liganden durchgeführt, um enantioselektiv zur gewünschten Alkoholfunktion zu gelangen (Abb. 49).

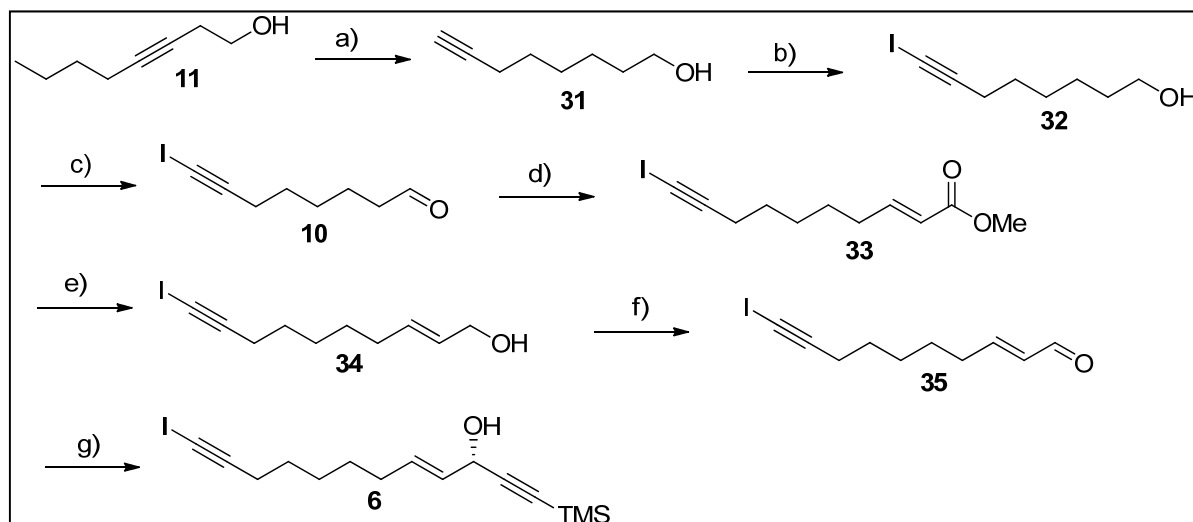


Abbildung 49: Syntheseüberblick 2. Baustein; a) NaH, Ethylendiamin, 65°C, 1h, 96%; b) I₂, KOH, MeOH, RT, 3,5 h, 84%; c) DMP, DCM, RT, 1 h, 87%; d) Ph₃PCHCO₂CH₃ (**36**), DCM, RT, 12 h, 94%; e) DIBAL-H, THF, -78°C, 2 h, 93%; f) MnO₂, DCM, RT, 12 h, 87%; g) Trimethylsilylacetylen (**37**), Me₂Zn, (R,R)-(-)-2,6-Bis[2-(hydroxydiphenylmethyl)1-pyrrolidinyl-methyl]-4-methylphenol, Toluol, 4°C, 4 d, 76%.

3.1.3.1 Umlagerung von 3-Octin-1-ol (**11**)

Bei der ersten Reaktion zur Darstellung des 2. Bausteines handelte es sich um eine Umlagerungsreaktion, bei der die Dreifachbindung aus der Mitte des Moleküls zu einer endständigen Dreifachbindung isomerisiert wurde.

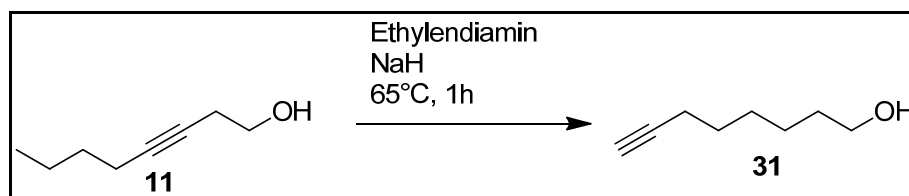


Abbildung 50: Umlagerungsreaktion.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Denmark *et al.* durchgeführt,^[184] dabei diente das Ethylendiamin sowohl als Reagenz als auch als Lösungsmittel. Bei der

Reaktion wurden verschiedene Temperaturen zu verschiedenen Zeitpunkten verwendet. So wurde zum Beispiel NaH bei 0°C zum Ethylendiamin zugegeben, die folgende Deprotonierungsreaktion aber bei 60°C durchgeführt. Bevor das eigentliche Edukt **11** zugegeben wurde, wurde die Lösung auf 45°C abgekühlt, anschließend zur weiteren Reaktionsführung aber wieder auf 65°C erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde dann erneut auf 0°C abgekühlt. Das Produkt **31** konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 96% synthetisiert werden.

3.1.3.2 Oxidation und anschließende Wittigreaktion

Zur weiteren Synthese sollte zunächst eine Kettenverlängerung via Wittigreaktion mit gleichzeitiger Einführung der Doppelbindung stattfinden. Dazu musste der Alkohol **31** zunächst zum Aldehyd **38** oxidiert werden (Abb. 51).

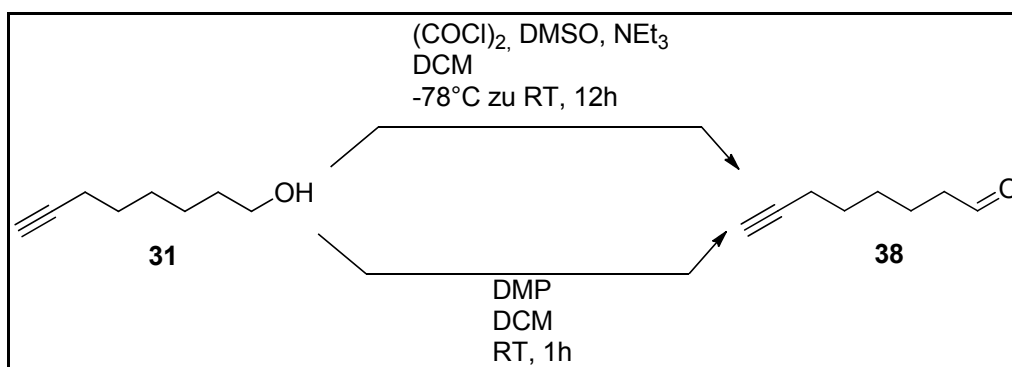
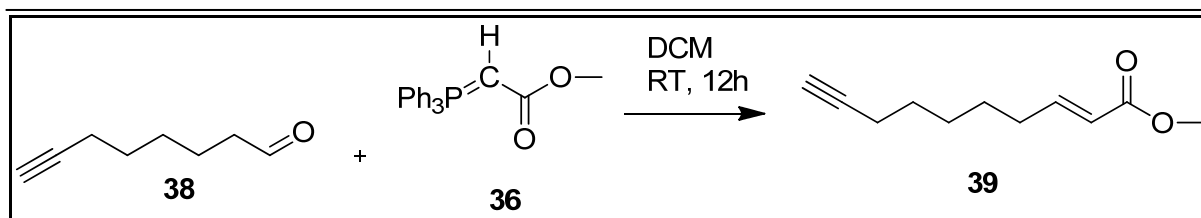


Abbildung 51: Oxidation von **31**.

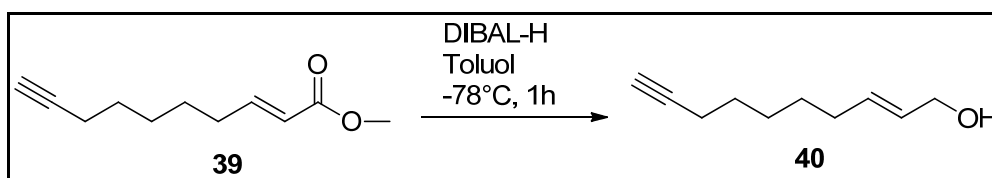
Zunächst sollte eine Swernoxidation durchgeführt werden, analog zu der Vorschrift von Petri *et al.*^[185] Die Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 56% durchgeführt werden, erwies sich allerdings als recht unzuverlässig, da in anderen Ansätzen die Ausbeuten stark schwankten. Deshalb wurde im Folgenden eine andere Methode gewählt. Als Alternative wurde die Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan durchgeführt. Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Yadav *et al.* bei RT durchgeführt und bereits nach 1h war das Edukt **31** vollständig umgesetzt.^[186] Die Aufarbeitung stellte sich als etwas schwierig heraus, da sich nach Quenchen mit ges. K_2CO_3 -Lösung ein weißer, schaumiger Feststoff bildete, der sich schwerlich extrahieren ließ. Das Produkt **38** konnte mit einer Ausbeute von 90% isoliert werden und wurde zeitnah in der darauffolgenden Wittigreaktion eingesetzt (Abb. 52).

Abbildung 52: Wittigreaktion von **38** zu Intermediat **39**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Marco-Contelles *et al.* durchgeführt,^[187] die Reaktionszeit wurde allerdings nach DC-Kontrolle auf über 12 h erhöht. Das Wittigreagens Methyl-2-(triphenylphosphoranylidene)acetat ist kommerziell erhältlich und konnte ohne Voraktivierung in die Reaktion eingesetzt werden. Es wurde nach der Reaktion nur das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und anschließend eine Kieselgelsäule zur Aufreinigung durchgeführt. Die Reaktion verlief dabei mit einer Ausbeute von 81%.

3.1.3.3 Reduktion zum Alkohol **40**

Der vorhandene Methylester **39** musste in einem nächsten Schritt zum Alkohol **40** reduziert werden (Abb. 53).

Abbildung 53: Reduktion des Methylesters **39** zum Alkohol **40**.

Die Reaktion wurde analog zu der Vorschrift von Fürstner *et al.* bei -78°C für 1 h durchgeführt.^[188] Die Aufarbeitung erfolgte mit EA und K-Na-Tartrat. Nach Zugabe von K-Na-Tartrat wurde die Reaktionslösung auf 45°C erwärmt, um eine klare Phasentrennung zu erreichen. Das Produkt **40** konnte mit einer Ausbeute von 92% isoliert werden.

3.1.3.4 Oxidation und anschließende Alkinylierungsreaktion mit Einführung des Stereozentrums

Um die im Naturstoff endständige Dreifachbindung einzuführen, musste als Vorläufer zunächst der Alkohol **40** zum Aldehyd **41** oxidiert werden (Abb. 54).

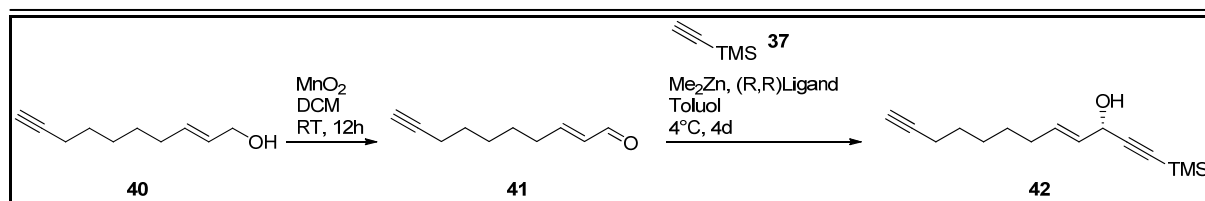


Abbildung 54: Oxidation mit Manganoxid zum α,β -ungesättigten Aldehyden **41** und anschließende enantioselektive Umsetzung zum Allylalkohol **42**.

Die Reaktion wurde wiederum analog zur Vorschrift von Fürstner *et al.* durchgeführt.^[188] MnO_2 wurde hierzu zuvor im Trockenofen etwas erhitzt und anschließend als Feststoff zur Reaktionslösung in kleinen Portionen zugegeben. Das Produkt **41** konnte in 83% Ausbeute isoliert werden und wurde ohne Lagerung direkt in die folgende Alkinylierungsreaktion eingesetzt, welche analog zur Vorschrift von Trost *et al.* durchgeführt wurde.^[169] Als Ligand wurde der in dieser Publikation beschriebene Katalysator (R,R) -(-)-2,6-Bis[2-(hydroxydiphenylmethyl)1-pyrrolidinylmethyl]-4-methylphenol verwendet, welches eine Addition zum Alkohol in der (S) -Konformation bewirkt. Die Reaktion verlief jedoch nur in einer Ausbeute von 20%. Ein zweiter Versuch mit einem enantiomeren Katalysator führte demgegenüber zum (R) -konfigurierten Alkohol in 36% Ausbeute.

3.1.3.5 Einführung eines Broms an der terminalen Dreifachbindung

Trotz der geringen Ausbeuten bei der Alkinaddition sollten die Reaktionsbedingungen der Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung ausgetestet werden. Hierzu muss die Dreifachbindung jedoch in ein Halogen-Alkin überführt werden. Um die hierzu benötigten Reaktionsbedingungen zu etablieren, wurde deshalb zuerst eine Testreaktion mit 4-Pentin-1-ol (**17**) durchgeführt (Abb. 55).

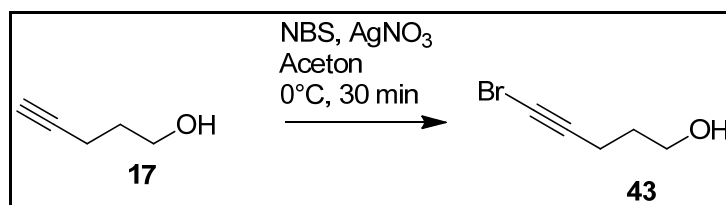


Abbildung 55: Bromierung der Dreifachbindung am 4-Pentin-1-ol (**17**).

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Munakata *et al.* mit Silbernitrat und NBS in Aceton durchgeführt.^[189] Das Produkt **43** konnte dabei in einer Ausbeute von 37% isoliert werden. Nach diesem moderaten Ergebnis wurde die gleiche Reaktion an Intermediat **40** getestet (Abb. 56).



Abbildung 56: Bromierung des durch DIBAL-H Reduktion-erhaltenen Intermediates **40**.

Auch hier wurde nach der Vorschrift von Munakata *et al.* vorgegangen und das Produkt **44** konnte in 40% Ausbeute erhalten werden.^[189] Da die Ausbeute wiederum nicht sehr zufrieden stellend war, wurde auch die Einführung des Broms nach der Wittigreaktion ausprobiert (Abb. 57).

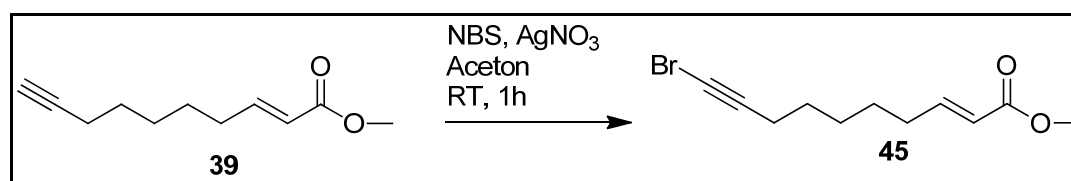


Abbildung 57: Bromierung der Dreifachbindung des nach der Wittigreaktion-erhaltenen Intermediates **39**.

Auch diese Reaktion wurde nach dem vorherigen Protokoll durchgeführt,^[189] nur die Reaktionszeit wurde nach DC-Kontrolle auf 1 h verlängert. Überraschenderweise konnte das Produkt **45** hier mit einer Ausbeute von 78% isoliert werden.

3.1.3.6 Vervollständigung des 2. Bausteins mit der bromierten Dreifachbindung

Deshalb wurde nun an diesem Intermediat **45** die Reaktionssequenz zum Propargylalkohol wiederholt (Abb. 58).

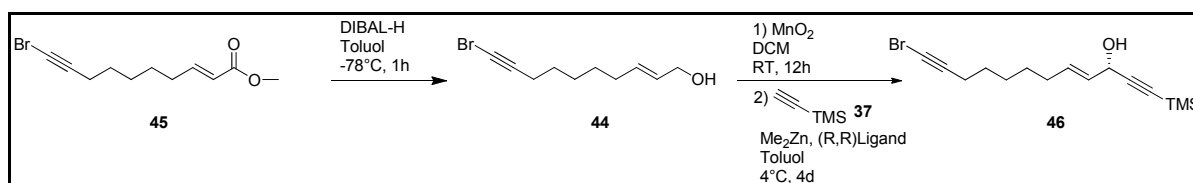


Abbildung 58: Reduktion des Methylesters **45** zum Alkohol **44** mit bromierter Dreifachbindung und anschließender Alkinylierung.

Der nächste Schritt war somit die Reduktion mit DIBAL-H, welche wie bereits beschrieben durchgeführt wurde.^[188] Das Produkt **44** konnte mit einer Ausbeute von 70% erhalten werden. Erfreulicherweise ergab die anschließende Oxidation,^[188] gefolgt von der Alkinylierung nach Trost eine Ausbeute von 63% über die beiden Schritte.^[169]

3.1.3.7 Synthese von Iodalkinderivaten zur Durchführung der Cadiot-Chodkiewicz Reaktion

Da eine Cadiot-Chodkiewicz Reaktion nicht nur mit Bromalkinen, sondern auch mit Iodalkinen durchgeführt werden kann, wurden auch diese entsprechende Derivate synthetisiert. Hierzu wurde wiederum zuerst eine Testreaktion mit 4-Pentin-1-ol (**17**) durchgeführt (Abb. 59).

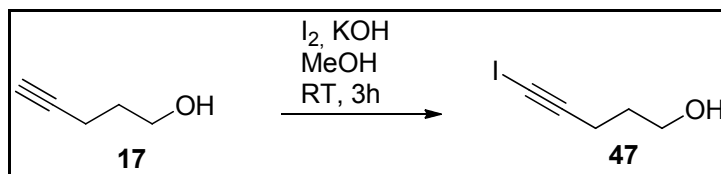


Abbildung 59: Iodierung des Alkins von 4-Pentin-1-ol (**17**).

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Denmark *et al.* durchgeführt,^[184] wobei KOH in einer wässrigen Lösung bei 0°C zu dem gelösten Edukt **17** zugegeben wurde. Nach der anschließenden Zugabe von Iod wurde die Reaktion dann auf RT erwärmt und für 3 h gerührt. Das Produkt **47** wurde nach Aufarbeitung und Reinigung mit einer Ausbeute von 68% erhalten. Der Erfolg der Testreaktion führte dazu, dass die gleiche Reaktion noch einmal nach der Umlagerungsreaktion von 3-Octin-1-ol (**11**) durchgeführt wurde (Abb. 60).

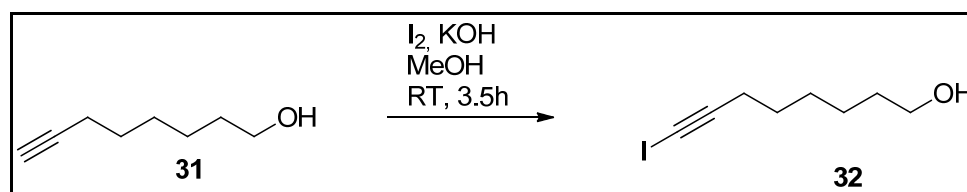
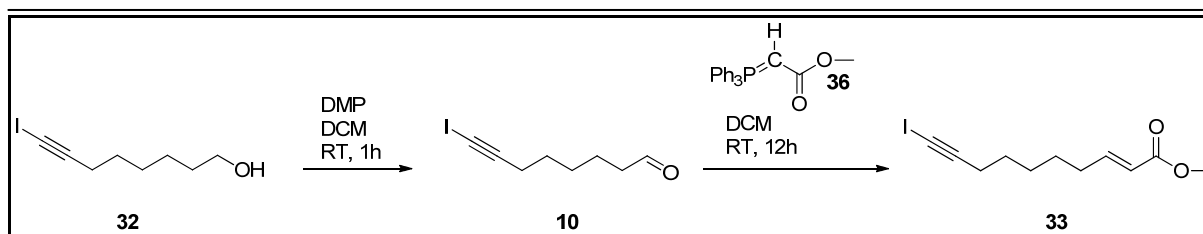


Abbildung 60: Iodierung des Alkins **31**.

Die Reaktionszeit wurde nach DC-Kontrolle um 0.5 h verlängert und das Produkt **32** in einer Ausbeute von 84% erhalten.

3.1.3.8 Oxidation und anschließende Wittigreaktion mit dem Iodalkin **32**

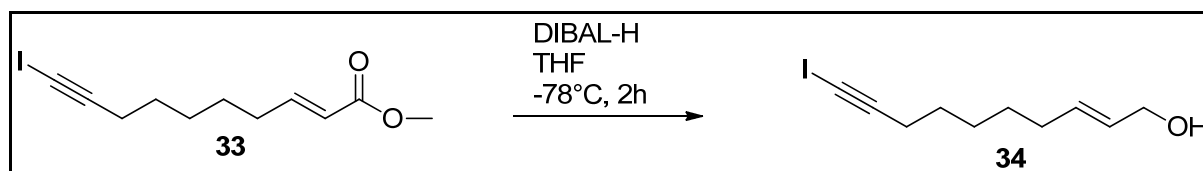
Die Synthese wurde analog zu den oben beschriebenen Versuchen durchgeführt. Es folgte also eine Oxidation des Alkohols **32** zum Aldehyd **10**,^[186] um die Vorstufe für die Wittigreaktion zu erhalten.

Abbildung 61: DMP-Oxidierung und anschließende Wittigreaktion von **10**.

Leider stellte sich die Aufarbeitung der Reaktion als sehr schwierig heraus, da nur eine ungenügende Phasentrennung auftrat. Trotzdem konnte das Produkt **10** am Ende mit einer Ausbeute von 87% erhalten werden, und wurde dann zeitnah in der nächsten Reaktion eingesetzt. Hier wurden dieselben Reaktionsbedingungen verwendet,^[187] wie zuvor beschrieben, so dass das Produkt **33** mit 94% Ausbeute erhalten werden konnte. Bei der Reaktion fand keine weitere Aufarbeitung statt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und anschließend das Rohprodukt direkt säulenchromatographisch aufgereinigt. Dazu musste das Rohprodukt in etwas MeOH gelöst werden, da der Feststoff Phosphoroxid ausfiel.

3.1.3.9 Reduktion des Methylesters **33** zum Alkohol **34**

Im nächsten Schritt wurde der Methylester **33** zum Alkohol **34** reduziert (Abb. 62).

Abbildung 62: Reduktion von **33** mit DIBAL-H.

Hier wurde zunächst die DIBAL-H Lösung in Toluol verwendet, bei einem späteren Versuch wurde jedoch auf DIBAL-H in Hexan umgestiegen. Als Lösungsmittel der Reaktion wurde THF verwendet, so dass das gewünschte Produkt **34** in einer Ausbeute konnte von 93% erhalten werden konnte.

3.1.3.10 Oxidation und anschließende Alkynylierung zum 2. Baustein

Da in der vorangegangenen Reaktion der Alkohol **34** erhalten wurde, musste er auch hier zum Aldehyd **35** oxidiert werden, bevor die stereoselektive Alkynylierung durchgeführt werden konnte (Abb. 63).

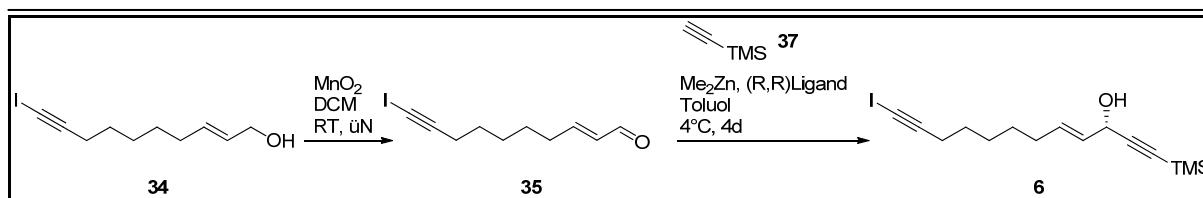


Abbildung 63: Oxidation und Alkinylierung zum Intermediat **6**.

Auch bei dieser Reaktion wurden die vorher etablierten Bedingungen verwendet.^[188] So wurde wieder im Trockenofen erhitztes MnO_2 eingesetzt und anschließend in kleinen Portionen als Feststoff zugegeben. Nach der Reaktion wurde das MnO_2 über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach der Aufreinigung konnte das Produkt **35** in 87% erhalten werden und wurde ohne Lagerung direkt in der Alkinylierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Trost *et al.* und den vorangegangenen Versuchen durchgeführt.^[169] Dabei wurde zuerst eine Lösung aus Me_2Zn und TMS-Acetylen (**37**) in Toluol zusammengegeben und ohne Rühren für 90 min gelagert. Der chirale Ligand (*R,R*)-(-)-2,6-Bis[2-(hydroxydiphenylmethyl)1-pyrrolidiny]methyl-4-methylphenol wurde im Anschluss in einen frischen, trockenen Kolben vorgelegt und die Lösung langsam zugegeben, dabei konnte eine Gasentwicklung beobachtet werden. Diese Mischung wurde für 10 min gerührt und anschließend auf 0°C gekühlt. Das Edukt **35** wurde in Toluol gelöst und langsam zugegeben. Der Kolben wurde anschließend gut verschlossen und für 4 Tage in den Kühlschrank gestellt. Während dieser Zeit bildete sich ein weißer Feststoff, der sich nach dem Quenchen mit ges. NH_4Cl -Lösung wieder löste. Nach Aufarbeitung konnte dann das gewünschte Produkt **6** mit einer Ausbeute von 76% isoliert werden.

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurde das Produkt **6** parallel sowohl mit dem (*R*)-(-)-MTPA-Cl, als auch mit dem (*S*)-(+)-MTPA-Cl und Pyridin in CDCl_3 versetzt und 4h gerührt.^[190] Diese Mosher-Reaktion wurde direkt im NMR-Maßstab mit deuteriertem Lösungsmittel durchgeführt, so dass eine direkte Messung ohne Aufarbeitung stattfinden konnte, und möglichst wenig Substanz verwendet werden konnte. Die gebildeten Diastereomere ließen sich im NMR gut unterscheiden und anhand der Integrationen der Signale konnte eine Enantiomerenreinheit von 96% bestimmt werden. Zur Berechnung wurden dabei die Signale eines Protons der benachbarten Doppelbindung verwendet. Zudem wurde auch ein Drehwert bestimmt, hierzu wurde der 2. Baustein mit einer Konzentration von $c=0.5$ (0.5mg / 1mL) in EtOH gelöst. Da für diesen Baustein keine Vergleichswerte vorliegen, kann der

Drehwert nur angegeben und nicht verglichen werden. Der gemessene Drehwert beträgt +27.6 (bei einer Temperatur von 20 °C).

3.1.4 Kupplung beider Bausteine

In der nun anstehenden Cadiot-Chorkiewicz-Reaktion sollten sowohl die Brom- als auch die Iodalkine auf ihre Eignung getestet werden. Zuerst wurden jedoch Testreaktionen an den Brom- und Iodalkinen **43** und **47** durchgeführt (Abb. 64).

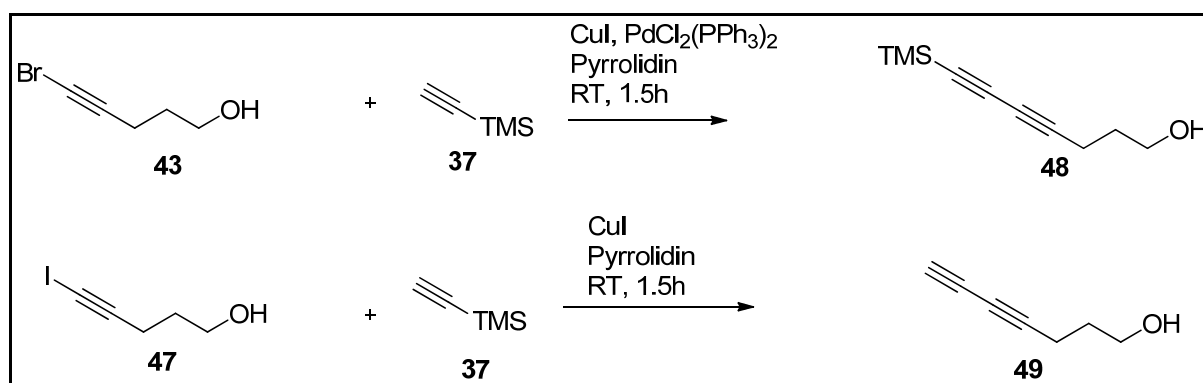
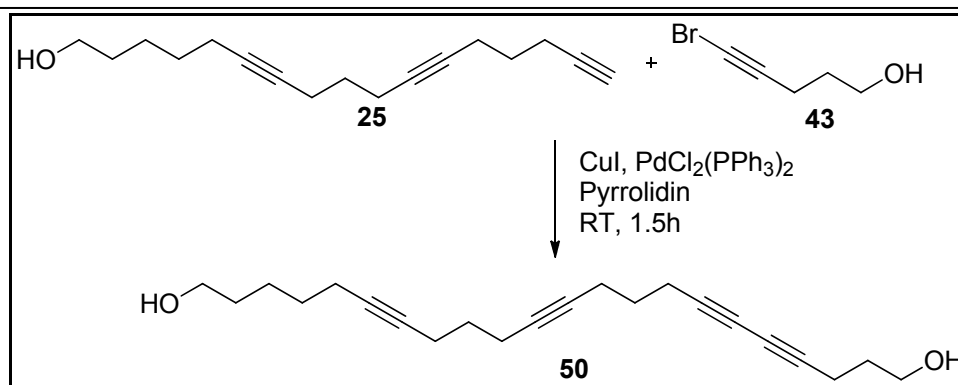
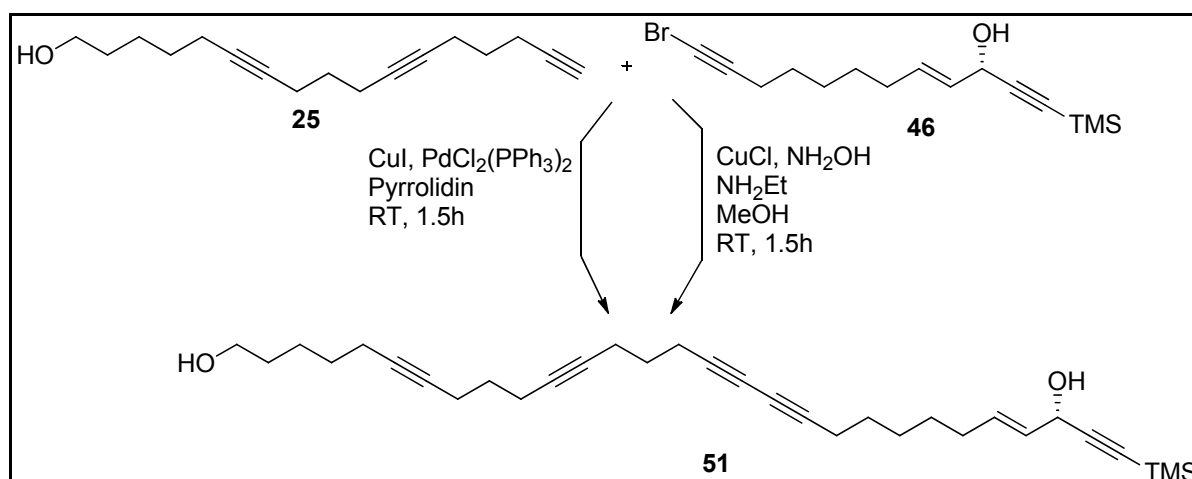


Abbildung 64: Testreaktionen zur Cadiot-Chorkiewicz Kupplung der beiden Bausteine.

Bei den Testreaktionen, die analog zur Vorschrift von Alami *et al.* durchgeführt wurden,^[191] wurden die beiden zuvor bromierten bzw. iodierten 4-Pentyn-1-ole **43** und **47** verwendet und jeweils mit dem TMS-geschützten Acetylen **37** umgesetzt. Bei der Reaktion mit dem bromierten Edukt **43** wurde zusätzlich zum CuI noch ein Pd -Katalysator zugefügt, welcher die Ausbeute des weniger reaktiven Bromeduktes steigern sollte. Die Reaktionen wurden parallel durchgeführt und die Reaktionszeit betrug jeweils 1.5h. Die Produkte konnten nach Aufarbeitung und Reinigung mit einer Ausbeute von 20% für Produkt **48** und mit 27% für das Produkt **49** erhalten werden, wobei sich herausstellte, dass die TMS-Gruppe bei der Reaktion mit dem iodierten Edukt **47** den Reaktionsbedingungen nicht standhält und teilweise abgespalten wurde. In einem nächsten Schritt wurde nun die Umsetzung mit dem Intermediat **25** aus der 1. Bausteinsynthese getestet (Abb. 65).

Abbildung 65: Testkupplung mit Intermediat **25**.

Dazu wurde **25** mit **43** analog zur Vorschrift von Alami *et al.* umgesetzt und die Reaktion nach verkürzter Reaktionszeit von 1.5 h gequencht und aufgearbeitet.^[191] Das Produkt konnte allerdings nur in Spuren gefunden werden. Nach diesem unerfreulichen Befund wurde daher im nächsten Schritt eine Kupplung mit komplexeren Bausteinen getestet (Abb. 66).

Abbildung 66: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung der Intermediate **25** und **46**.

Die Reaktionsbedingungen wurden wie bei den vorherigen Testreaktionen beibehalten.^[191] Allerdings konnte kein Produkt detektiert werden. In einem weiteren Versuch wurden dann die Reaktionsbedingungen geändert. Anstelle von CuI , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ und Pyrrolidin wurden CuCl , NH_2OH , NH_2Et in MeOH verwendet,^[192] allerdings brachte auch diese Veränderung kein positiveres Ergebnis.

Als nächstes wurden deshalb die Kupplungsreaktionen mit den iodierten Alkinen durchgeführt. Hierzu wurde zuerst eine Kupplung zwischen **6** und **25** ausprobiert (Abb. 67).

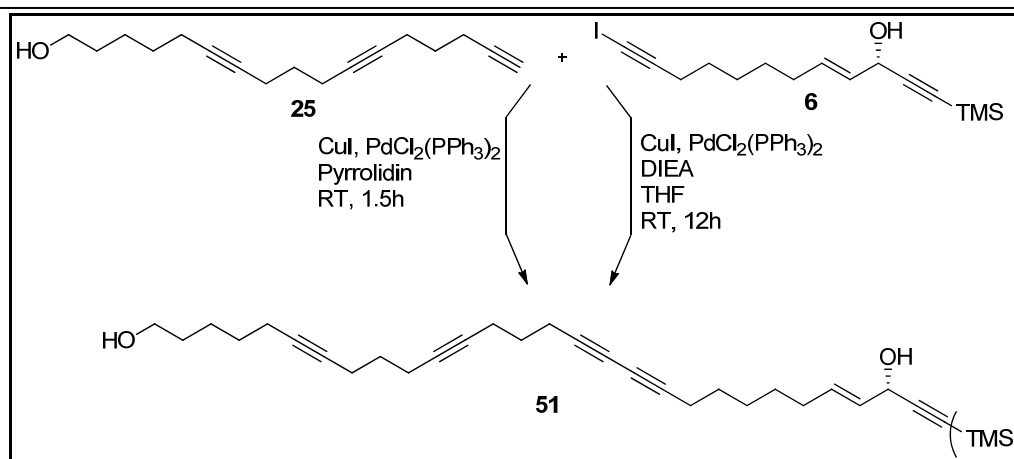
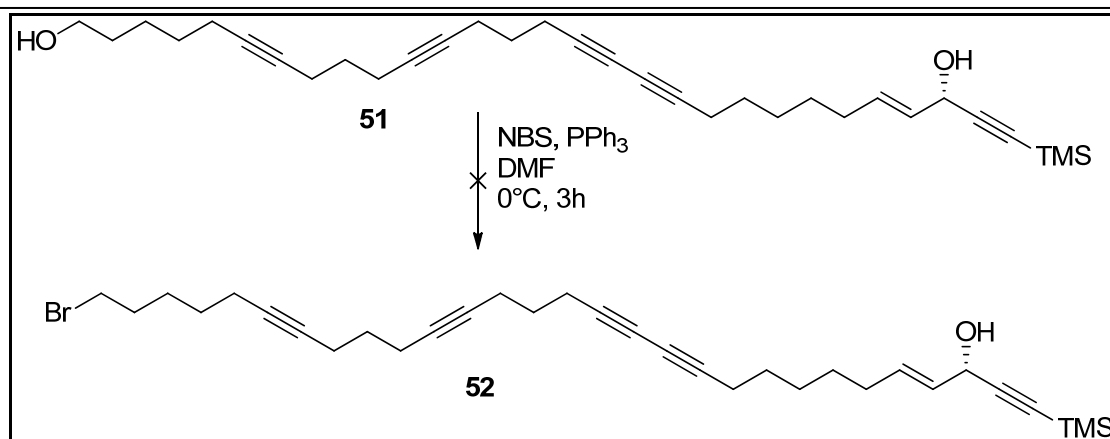


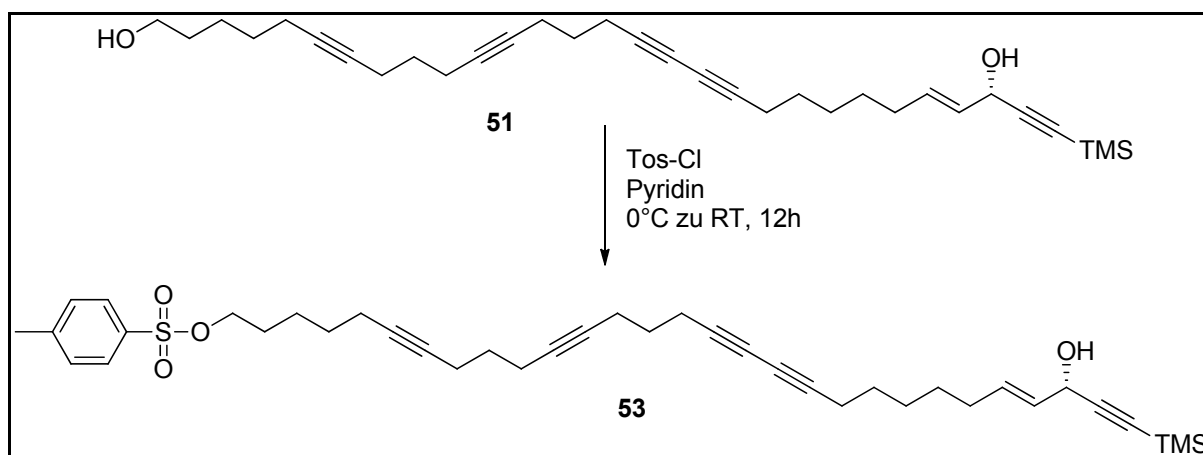
Abbildung 67: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung des iodierten Alkins **6** mit Intermediat **25**.

Bei dieser Kupplung wurden die bereits beschriebenen Bedingungen benutzt.^[191] Es konnte beobachtet werden, dass auch hier die TMS-Schutzgruppe teilweise abgespalten wurde, das Produkt **51** aber trotzdem in 45% Ausbeute erhalten werden konnte. Allerdings ließen sich nicht alle Reste des Katalysatorgemischs abtrennen. Anschließend wurden weitere Reaktionsbedingungen getestet, um die Ausbeute und die Reinheit der Kupplungsprodukte zu steigern. Zum einen wurde eine Reaktion ohne Zugabe eines Pd-Katalysators (also nur in Gegenwart des Cu-Katalysators) durchgeführt, was allerdings zu einem Ausbeuteverlust führte. Anstelle von Pyrrolidin wurde DIEA verwendet und THF als Lösungsmittel eingesetzt,^[193] was zu einer Ausbeute von 43% führte. Interessanterweise verringerte sich bei dieser Base die Abspaltung der TMS-Schutzgruppe während der Kupplung und das Produkt enthielt weniger Verunreinigungen durch das Katalysatorgemisch. Somit wurde die Kombination CuI , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, DIEA in THF als geeignete Bedingungen für die Kupplung ausgewählt.^[193]

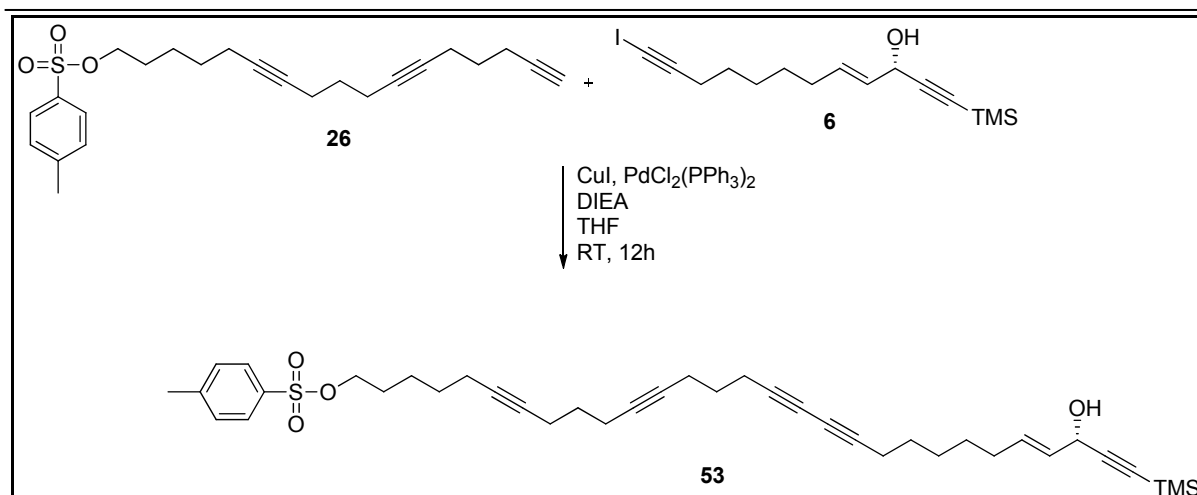
Mittels des gekuppelten Produktes sollte nun ausgetestet werden, inwiefern Modifikationen an der primären Alkoholfunktion durchgeführt werden können, um über diesen Reaktionsweg die Säurefunktion einzuführen. Daher wurde zunächst versucht, den Alkohol in **51** gegen ein Brom auszutauschen (Abb. 68).

Abbildung 68: Bromierung von **51**.

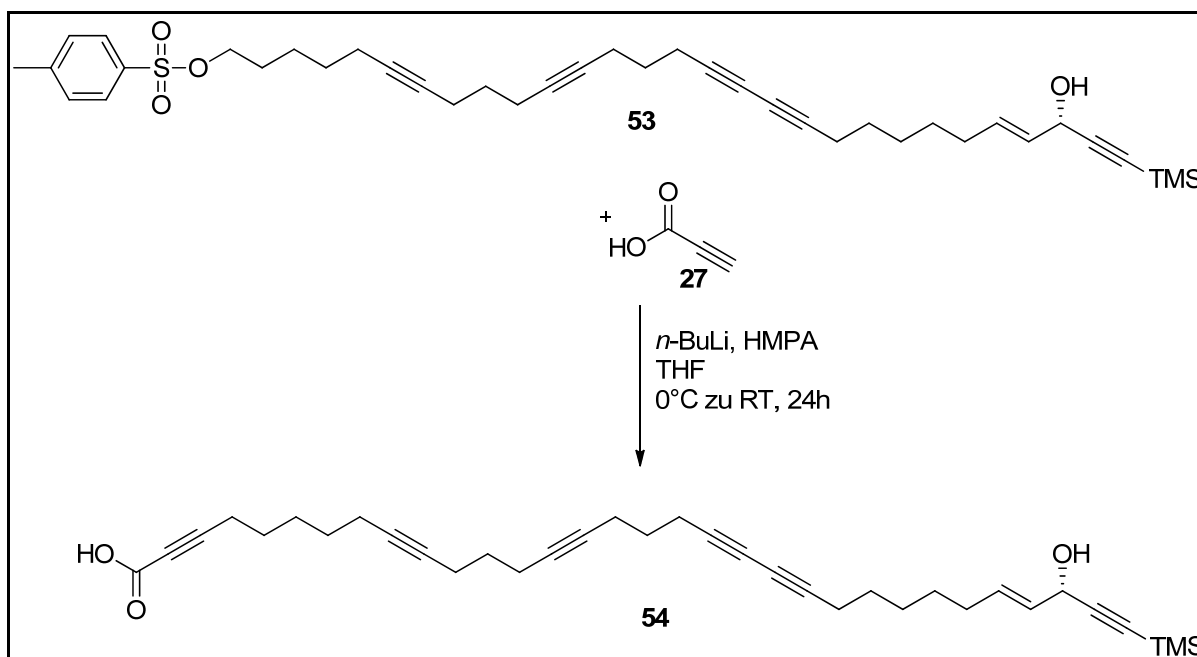
Dazu wurde die bereits etablierten Reaktionsbedingungen verwendet und das Edukt **51** zusammen mit dem PPh₃ in DMF gelöst und anschließend bei 0°C das in DMF gelöste NBS zugegeben.^[176] Erstaunlicherweise konnte kein Produkt isoliert werden, vermutlich aufgrund einer Nebenreaktion an der zweiten, freien Hydroxylgruppe. Da eine Tosylierung im Allgemeinen mit einer besseren Regioselektivität für primäre Hydroxyle verläuft, wurde als nächstes die Tosylierung des Alkohols **51** ausprobiert (Abb. 69).

Abbildung 69: Tosylierung von **51**.

Bei dieser Reaktion wurden die schon bekannten Reaktionsbedingungen gewählt.^[180] Das Produkt **53** konnte dabei in einer Ausbeute von 37% erhalten werden. Alternativ wurde versucht, das aus den Studien zur Synthese des 1. Bausteines bereits vorhandene Intermediat **26** direkt in der Cadiot-Chokiewicz-Kupplung zu verwenden (Abb. 70).

Abbildung 70: Cadiot-Chokiewicz Kupplung des tosylierten Alkohols **26** mit **6**.

Die Reaktion wurde wie in der Vorschrift von Wityak *et al.* beschrieben durchgeführt und das Produkt **53** konnte in einer Ausbeute von 72% isoliert werden, allerdings wiederum leicht verunreinigt mit Resten des Katalysatorgemisches.^[193] Nichtsdestotrotz sollte dieses Intermediat nun in einer Umsetzung zur Säure getestet werden (Abb. 71).

Abbildung 71: Kupplung von **53** und **27** zur Säure **54**.

Die Reaktion wurde analog zu den vorangegangenen Alkinkupplungsreaktionen durchgeführt.^[176] Als Anfangsreaktionstemperatur wurde 0°C verwendet und die Reaktion konnte sich über Nacht auf RT erwärmen. Allerdings konnte – wie in den vorherigen Kupplungsversuchen mit der Säure **27** – das Produkt nur in Spuren nachgewiesen werden. Da auch nach weiteren Versuchen unter

Variierung der Reaktionsbedingungen keine signifikante Verbesserung beobachtet werden konnte, sollte nun – analog zur erfolgreichen Synthese des 1. Bausteines – der Weg über ein Propargylalkohol mit anschließender Oxidation zur Säure gegangen werden. Deshalb musste zuerst der sekundäre Alkohol am 2. Baustein geschützt werden, da dieser in der folgenden Oxidationsreaktion sonst zum Keton oxidiert worden wäre (Abb. 72).

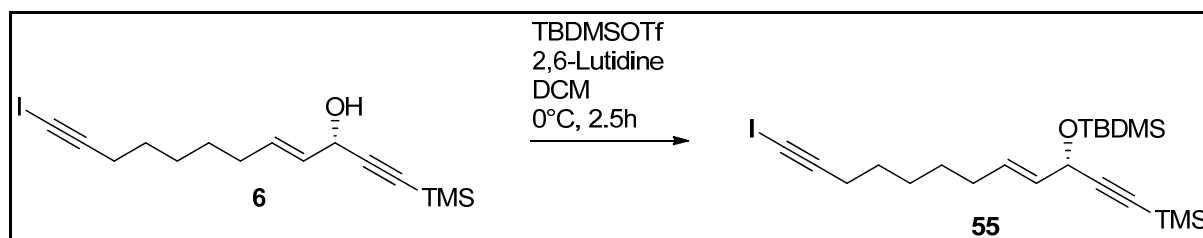


Abbildung 72: Einführen einer TBDMS-Schutzgruppe am sekundären Alkohol.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Boger *et al.* durchgeführt.^[194] Allerdings wurde die Menge an TBDMS-OTf und 2,6-Lutidin angepasst und die Reaktionszeit wurde nach DC-Kontrolle etwas verkürzt. Das Produkt **55** konnte in einer Ausbeute von 89% erhalten werden. Als nächstes wurde dann die Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung durchgeführt (Abb. 73).

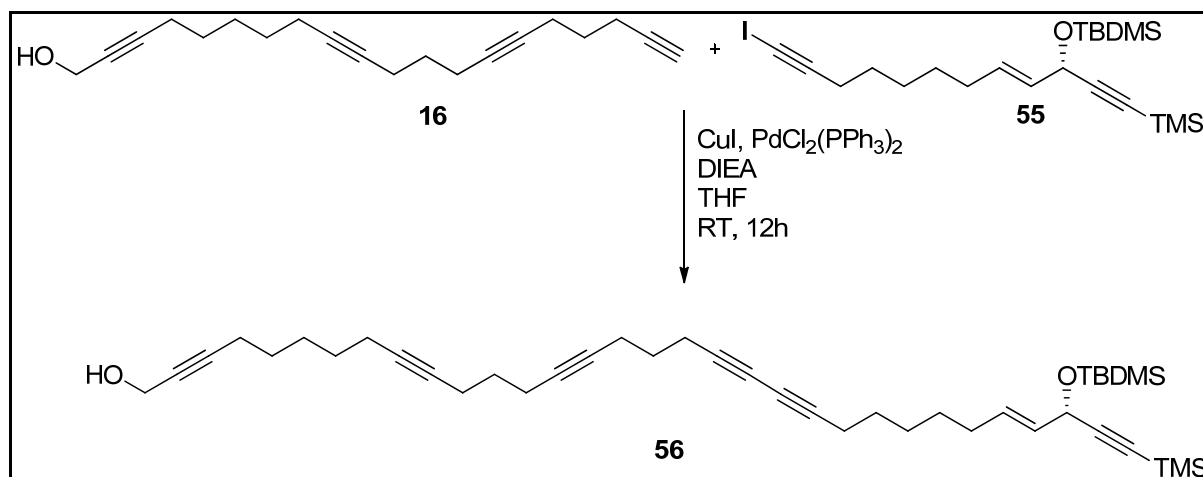
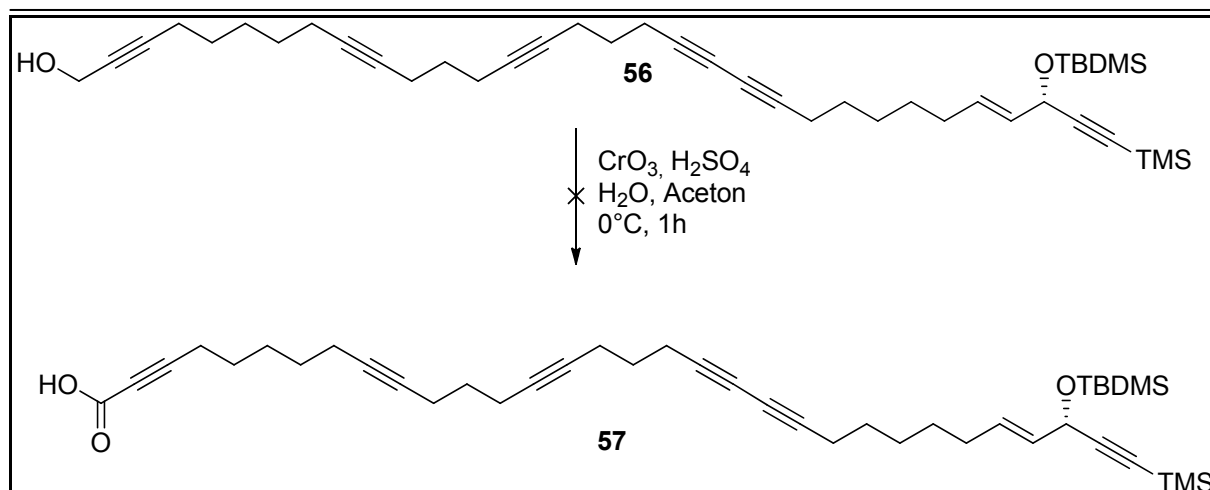


Abbildung 73: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung zwischen **16** und **55**.

Diese Kupplung wurde ebenfalls unter den vorher verwendeten Bedingungen durchgeführt und das Produkt konnte in 25% Ausbeute isoliert werden.^[193] Trotz dieser geringen Ausbeute wurde dann der nächste Schritt, die Oxidation des Alkohols **56** zur Säure **57**, durchgeführt (Abb. 74).

Abbildung 74: Oxidation von **56** zur Säure **57**.

Diese Oxidation wurde auch wieder nach die Jonesmethode durchgeführt.^[183] Dazu wurde eine Chrom-Schwefelsäure-Stammlösung angesetzt, die dann zur Reaktionslösung bei 0°C gegeben wurde. Leider konnte bei dieser Reaktion kein Produkt gefunden werden; ein Grund hierfür könnte die geringe Stabilität der TBDMS-Schutzgruppe im Säuren in Verbindung mit einer anschließenden säure-katalysierten Eliminierung des Alkohols sein. Deshalb wurde nun dazu übergegangen, das bereits eine Säuregruppe-tragende Intermediat **5** in einer Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung einzusetzen (Abb. 75).

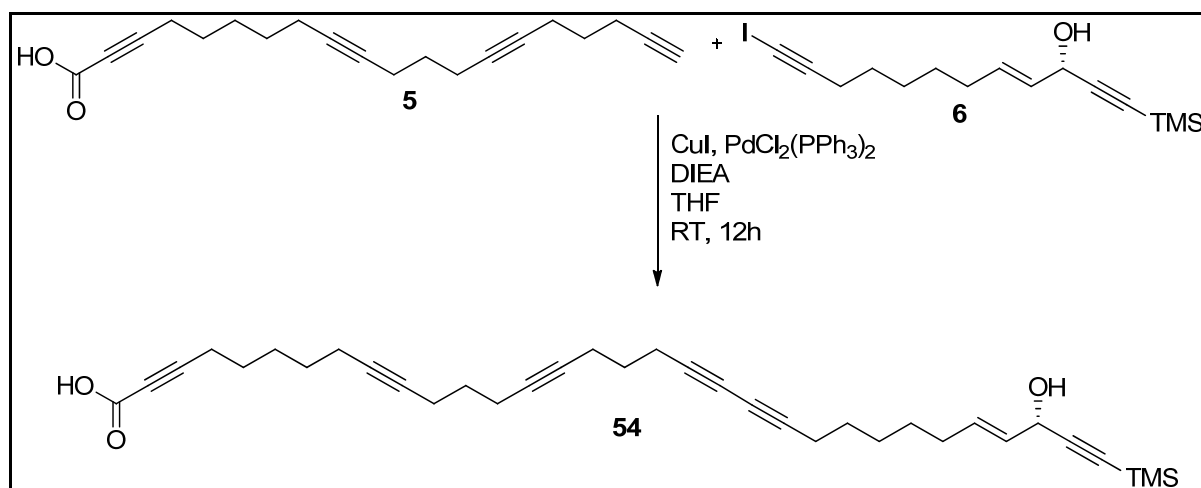


Abbildung 75: Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung.

Auch hier wurden die schon bekannten Reaktionsbedingungen verwendet.^[193] Die Reaktion wurde durch Zugabe von HCl beendet, welche zeitgleich eine Protonierung der Säurefunktion und somit eine Löslichkeit in der bei der Aufbereitung verwendeten organische Phase zu gewährleisten. Da auch hier wieder Spuren des Katalysators

gefunden wurden, wurde zusätzlich zu der durchgeführten Kieselgelsäulenchromatographie mit DCM/MeOH als Eluentenpaar eine weitere RP-C18-Säulenchromatographie mit Acetonitril/H₂O als Eluenten durchgeführt. Dadurch konnten die Katalysatorreste entfernt werden und das Produkt sauber erhalten werden. Da das saubere Produkt **54** ein Stereozentrum enthielt, wurde auch hier ein Drehwert gemessen. Dieser beläuft sich bei 20 °C auf einen Wert von + 6.2 bei einer Konzentration von c= 0.5 (0.5 mg/1mL) in EtOH. Im letzten Schritt musste nun noch die TMS-Schutzgruppe entfernt werden (Abb. 76).

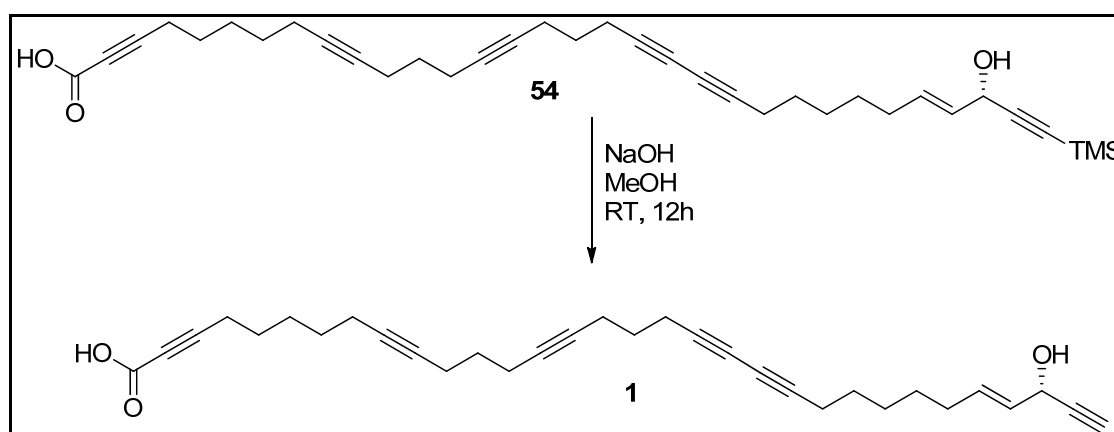


Abbildung 76: Entschützen von **54** zum Zielmolekül Callysponginsäure (**1**).

Für diesen letzten Schritt, das Entschützen der endständigen Dreifachbindung, wurde 1M NaOH-Lösung verwendet und die Reaktion in MeOH analog zur Vorschrift von Jennings *et al.* durchgeführt.^[195] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung säulenchromatographisch gereinigt. Callysponginsäure (**1**) konnte dabei als klares Öl in einer Ausbeute von 71% erhalten werden. Zur Charakterisierung wurden ¹H- und ¹³C-NMR Spektren, sowie ein Massenspektrum aufgenommen. Außerdem wurde wiederum ein Drehwert bestimmt, der in diesem Fall mit dem in der Literatur angegebenen Wert verglichen werden konnte. Dabei zeigte die synthetische Callysponginsäure (**1**) bei einer Konzentration von c=0.5 (0.5 mg/1mL) in EtOH und einer Temperatur von 20 °C einen Drehwert von +5.8°. Der in der Literatur angegebene Wert beträgt dabei unter den gleichen Bedingungen +5.4°,^[163] somit kann davon ausgegangen werden, dass der Naturstoff **1** in enantiomeren-reiner Form synthetisiert werden konnte.

3.1.5 Biologische Untersuchungen der Callysponginsäure (1)

Um die Aktivität des Naturstoffes Callysponginsäure (**1**, SN1-300) *in vivo* zu ermitteln, wurde zunächst dessen Wirkung auf eine *Arabidopsis thaliana*-Zellkultur untersucht. Sechs Tage alte Zellkultur wurde zunächst mit frischem Medium gewaschen und dann 2 h mit entweder der Negativkontrolle DMSO (5 μ L) oder dem Naturstoff (**1**, 10 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen, um überschüssige Sonde zu entfernen. Die gewaschenen Zellen wurden dann in flüssigem Stickstoff über Nacht eingefroren. Im nächsten Schritt wurden die Zellen aufgetaut, in 1x PBS Puffer aufgenommen und mechanisch aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und auf 1 mg/mL eingestellt. Um die Click-Reaktion zu unterstützen, wurde SDS der Proteinlösung zugesetzt (Endkonzentration 1%).^[168] Anschließend wurden die Click-Reagenzien (TBTA (100 μ M), TCEP (2 mM), CuSO₄ (1 mM)) zugegeben. Als Reporter wurde das trifunktionale Azid (**94**, 10 μ M) verwendet, dessen Synthese im Nachfolgenden beschrieben wird. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (10 mM) gestoppt und überschüssiges SDS durch Zugabe von 70 mM KCl gefällt und abzentrifugiert. Um vor der folgenden Affinitätsaufreinigung unverbrauchtes trifunktionales Azid zu entfernen, wurde die rotgefärbte, klare Lösung mittels einer PD-10 Säule in 1x PBS umgepuffert. Die anschließende Affinitätsaufreinigung erfolgte mit immobilisiertem Avidin (Avidinbeads). Nach einer Stunde Inkubation wurde der Überstand verworfen und das immobilisierte Avidin, an dem die biotinylierten Proteine gebunden hatten, 6 mal mit 1% SDS gewaschen. Die Avidinbeads wurden dann in 2x Gelladepuffer aufgenommen und 10 min bei 90 °C erhitzt. Anschließend wurde der Überstand (enthält die von der Matrix gelösten biotinylierten Proteine) auf eine SDS-PAGE aufgetragen und die Proteine mittels Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, inkubiert und anschließend eine Affinitätsaufreinigung mit Avidinbeads vorgenommen. Proteine, die mit Callysponginsäure (**1**) in der pflanzlichen Zelle reagiert haben, wurden anschließend mit Hilfe eines Typhoon-Fluoreszenzscanners im Gel sichtbar gemacht (Abb. 77). Ein Vergleich der beiden Spuren (DMSO versus Behandlung mit Callysponginsäure (**1**)) offenbarte dabei, dass Callysponginsäure (**1**) eine Vielzahl von Zielmolekülen im pflanzlichen Proteom hat. Die große Anzahl von „Targets“ in Zusammenhang mit der sehr hydrophoben Struktur und der freien Säurefunktion an Callysponginsäure (**1**) nährt den Verdacht, dass es sich um einen metabolischen Einbau des Moleküls handeln könnte. Um dies zu bestätigen, sind massenspektroskopische

Untersuchungen angestoßen worden, welche jedoch im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr zu Ende gebracht werden konnten. Diese sollen jedoch einerseits Rückschlüsse auf die Identität der „Targets“ und somit auf den möglichen Markierungsweg ermöglichen (z. B. bekannte posttranslationale Modifikationen). Des Weiteren sollte es somit möglich sein, mit Callysponginsäure (1)- modifizierte Peptide zu identifizieren und somit die von Nakao et al. beschriebene Aktivität zu bestätigen.^[163]

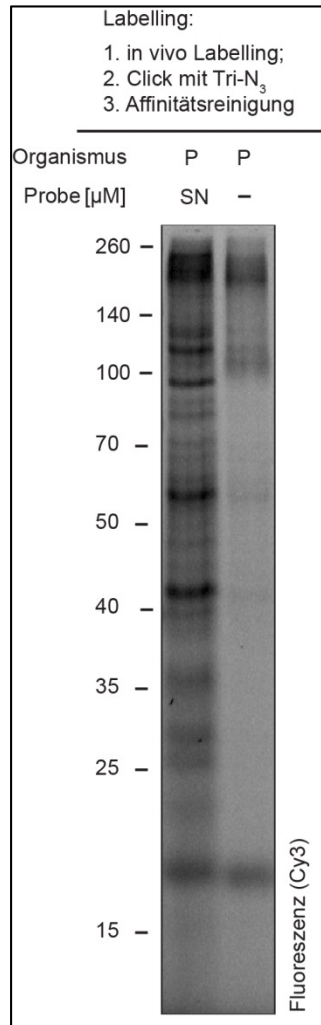


Abbildung 77: Fluoreszenzgel und Coomassie-gefärbtes Gel des Experimentes mit Callysponginsäure (1, hier als SN1-300 bezeichnet; das Gel wurde von Herrn Dr. Farnusch Kaschani durchgeführt).

3.2 Entwicklung Phosphonat-basierender Aktivitätsbasierter Sonden

3.2.1. Synthese einer PEG-Fluorophosphonatsonde als Vergleichssonde in ABPP

3.2.1.1 Syntheseüberblick Fluorophosphonatsonde 2

Die Synthese des PEG-basierten Fluorophosphonates **2** basiert in Wesentlichen auf der von der Arbeitsgruppe Cravatt-entwickelten Synthese von FP.^[12] Ausgangsmaterial der Synthese ist dabei kommerziell erhältlich Tetraethylenglykol (**58**). In dieser Synthesestrategie wurde zuerst das Phosphonat eingeführt und anschließend die endständige Dreifachbindung, welche der minimale Reporter für das 2-Stufen-ABPP darstellt oder als Intermediat für die Darstellung von Fluorophor- oder trifunktionalen Sonden mit einem Fluorophor und Biotin dient. Im letzten Schritt wurde dann das Phosphonat **64** zum Fluorophosphonat **2** umgewandelt (Abb. 78).

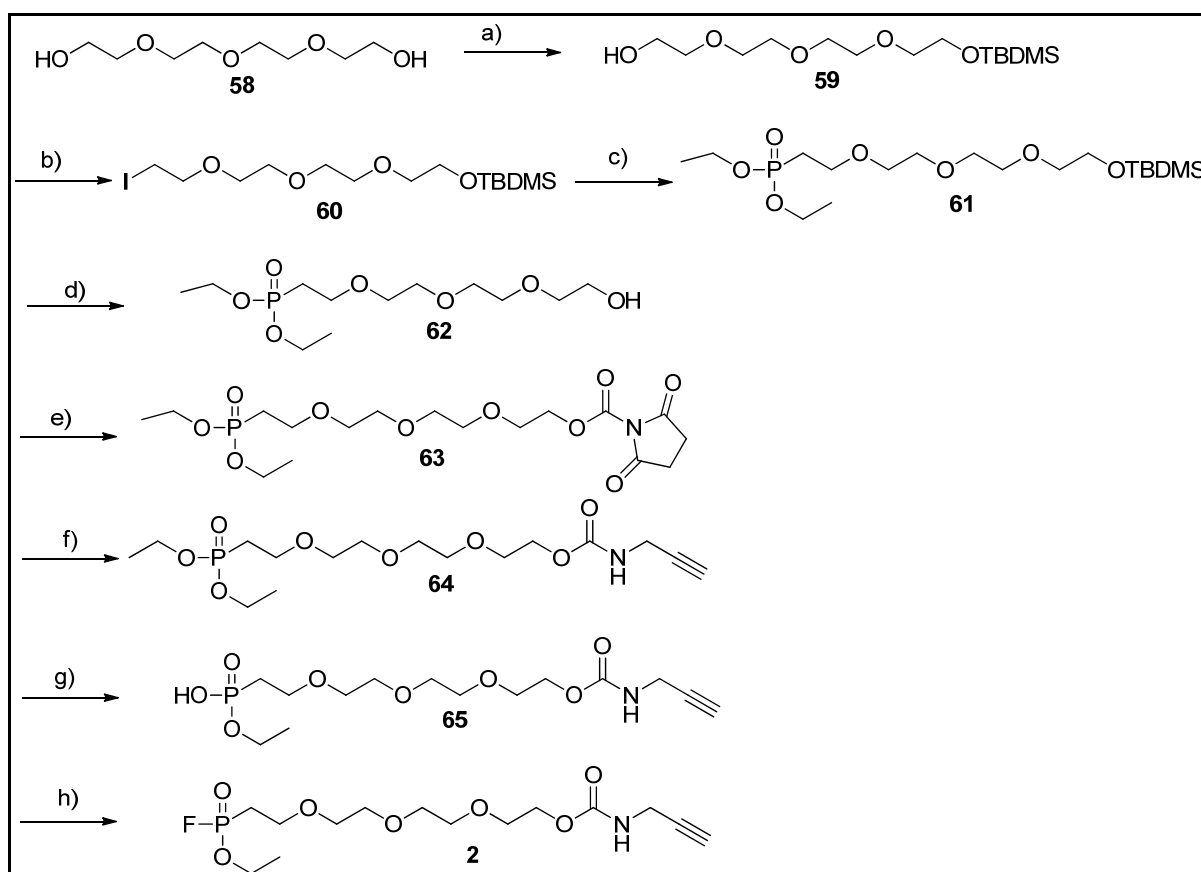


Abbildung 78: Syntheseübersicht zur Darstellung des Fluorophosphonats **2**, a) TBDMS-Cl, Imidazol, DCM, RT, 12h, 50%; b) I₂, PPh₃, Imidazol, Toluol, RT, 1.5h, 77%; c) P(OEt)₃, 150 °C, 1h, 91%; d) TBAF, THF, 0°C zu RT, 12h, 73%; e) DSC, NEt₃, DMF, RT, 12h, 49%; f) Propargylamin, NaHCO₃, MeOH, RT, 12 h, 80%; g) i) (COCl)₂, DCM, RT, 12h, ii) H₂O, RT, 10 min, 59%; h) DAST, DCM, -78 °C, 40 min, 62%.

3.2.1.2 Beschreibung der einzelnen Stufen

3.2.1.2.1 Einführung der TBDMS-Schutzgruppe

Die Synthese startete von Tetraethylenglykol (**58**), bei welchem im ersten Schritt eine der beiden Alkoholfunktionen mit einer TBDMS-Schutzgruppe geschützt wurde (Abb. 79).

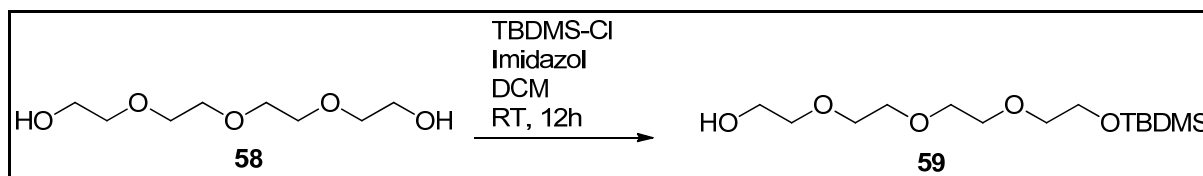


Abbildung 79: TBDMS-Schützen einer Alkoholfunktion am Tetraethylenglykol (**58**).

Bei der Reaktionsdurchführung wurde nach der Vorschrift von Kidd *et al.* vorgegangen,^[12] aufgrund der besseren PEG-Löslichkeit wurde jedoch DCM als Lösungsmittel verwendet. Dabei wurden das Edukt Tetraethylenglykol (**58**) und TBDMS-Cl in einem (1:1)-Verhältnis eingesetzt. Nach Zugabe von Imidazol wurde die Reaktion bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. NaHCO₃ gestoppt und aufgearbeitet. Zwar konnte das Produkt **59** nach Aufreinigung über eine Kieselgelsäule nur mit einer Ausbeute von 43% erhalten werden; Modifikationen der Reaktionsäquivalente führten jedoch auch in späteren Ansätzen zu keiner nennenswerten Ausbeutesteigerung, so dass diese Reaktionsführung auch in größeren Ansätzen verwendet wurde.

3.2.1.2.2 Überführung einer Hydroxylgruppe von **59** in eine Iodidabgangsgruppe

Im nächsten Schritt wurde die noch vorhandene Alkoholfunktion ein Iodid überführt, um somit eine Abgangsgruppe für die nachfolgende Phosphorylierung zu erhalten (Abb. 80).

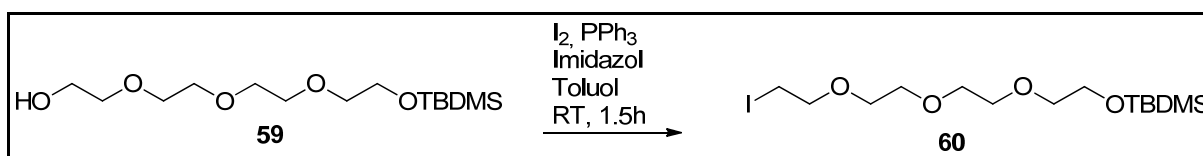


Abbildung 80: Einführung einer Iodidabgangsgruppe in **59**.

Auch hier wurde nach der Synthesevorschrift von Kidd *et al.* vorgegangen.^[12] Als Lösungsmittel wurde jedoch Toluol verwendet und die Reaktionszeit auf 1.5h verdreifacht. Dies war notwendig, da sich bei der Reaktion ein starker Bodensatz

bildete, der ein gutes Durchmischen der Reaktionsmischung erschwerte. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert und gewaschen. Das überschüssige Iod wurde durch Zugabe von ges. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung gequenchet und die Lösung anschließend mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Das Produkt **60** konnte in 77% Ausbeute erhalten werden. Bei späteren Versuchen wurden die Mengen an Iod, PPh_3 und Imidazol etwas verringert, allerdings ohne eine Ausbeutesteigerung bzw. –verluste feststellen zu können. Die Menge des Niederschlages konnte jedoch verringert werden, wodurch die Durchmischung der Reaktionsmischung und somit die praktische Implementierung der Reaktion erheblich vereinfacht werden konnte.

3.2.1.2.3 Phosphorylierung von **61**

Nun wurde die Phosphorylierung vorgenommen (Abb. 81).

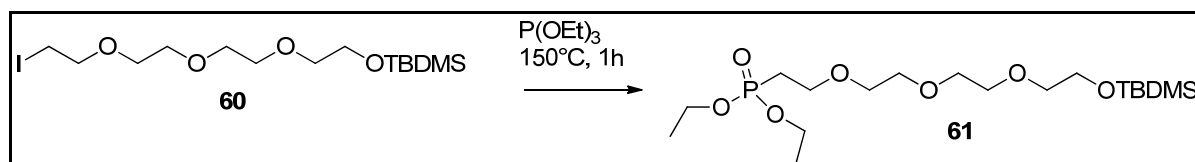


Abbildung 81: Phosphorylierung von **60** zum Phosponat **61**.

Bei dieser Reaktion wurde Triethylphosphit sowohl als Reagenz wie auch als Lösungsmittel eingesetzt.^[12] Die Reaktion wurde bei 150°C durchgeführt. Um das überschüssige Triethylphosphit anschließend wieder zu entfernen, wurde die auf RT abgekühlte Reaktionslösung einer Vakuumdestillation unterzogen. Die zurückbleibende Festsubstanz wurde über eine Kieselgelsäule aufgereinigt, so dass das gewünschte Produkt **61** in einer Ausbeute von 91% erhalten werden konnte.

3.2.1.2.4 Entfernen der TBDMS-Schutzgruppe

Zur Vorbereitung des Phosponats auf eine anschließende Kupplung mit dem Alkin-Reporter wurde als nächstes die TBDMS-geschützte Alkoholfunktion wieder freigesetzt (Abb. 82).

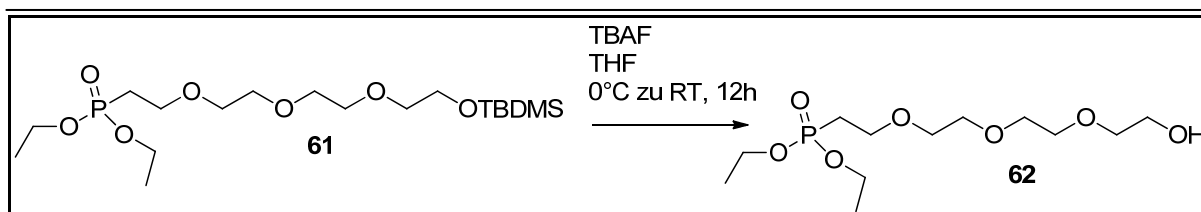


Abbildung 82: Entschützen der TBDMS-geschützten Alkoholfunktion.

Die hierzu notwendige Reaktion wurde mit TBAF in THF durchgeführt,^[196] wobei die TBAF-Zugabe bei 0°C erfolgte und die Reaktion anschließend unter Erwärmung auf RT über Nacht gerührt wurde. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von H₂O gequenchet und das Produkt extrahiert. Interessanterweise musste hierzu DCM als organische Phase eingesetzt werden, da bei Nutzung von Ethylacetat das Rohprodukt in der wässrigen Phase verblieb. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung konnte das Produkt **62** dann in 73% Ausbeute erhalten werden.

3.2.1.2.5 Einführung einer Acyl-hydroxysuccinimid-Gruppe

Da sich ein freier Alkohol zur Kupplung nicht eignet und die nachfolgenden Schritte eine Kupplung mit freien Aminen vorsah, wurde im nächsten Schritt eine Acylhydroxysuccinimid-Gruppierung eingeführt (Abb. 83).

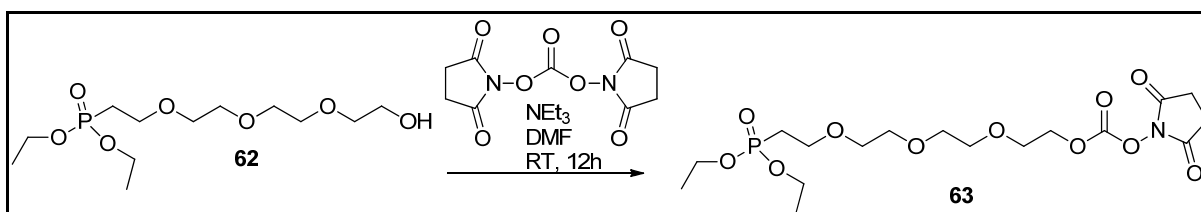


Abbildung 83: Reaktion mit DSC.

Bei dieser Reaktion wurde wieder nach der Vorschrift von Kidd *et al.* vorgegangen.^[12] Das Edukt **62** wurde in DMF gelöst und anschließend *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat und Base zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt und in DCM und H₂O aufgenommen. Nach Aufarbeitung und Reinigung über eine Kieselgelsäule konnte das Produkt in 49% Ausbeute erhalten werden, welches als Mischung eines gelben Öles und eines weißen Feststoffes auftrat.

3.2.1.2.6 Fluorierung des Hydroxysuccinimid-Phosphorsäurederivates **66**

Da nun die Hydroxysuccinimid-Abgangsgruppe für eine anschließende Kupplung mit einem Amin vorlag und somit die für die Kupplung mit dem Fluorophor bzw. der trifunktionalen Probe notwendige Einheit eingeführt werden konnte, stellte sich nun die Frage, zu welchem Zeitpunkt die Fluoridabgangsgruppe eingeführt werden sollte. In einem ersten Ansatz sollte versucht werden, diese auf der Stufe eines Hydroxysuccinimids einzuführen. Deshalb wurde nun selektiv eine der beiden Ethoxygruppen zur freien Säure hydrolysiert (Abb 84).

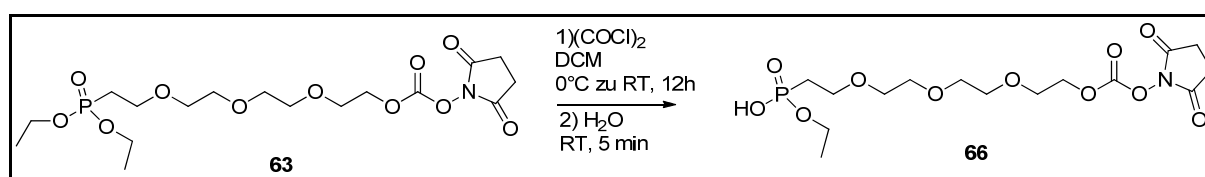


Abbildung 84: Hydrolyse von **63** zum Phosphorsäurederivat **66**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Kidd *et al.* durchgeführt.^[12] Dabei wurde Oxalylchlorid als 2M Lösung in DCM eingesetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel in einem Strom aus N₂ entfernt und H₂O zugegeben, wodurch das zuvor entstandene P-Cl-Derivat in die freie Säure hydrolysiert wurde. Das Wasser wurde anschließend erneut in einem N₂-Strom entfernt, so dass das Produkt **66** ohne weitere Aufarbeitung und Reinigung in einer Ausbeute von 99% erhalten werden konnte. Im nächsten Schritt erfolgte dann die Fluorierung des Phosphorsäurederivates **66** (Abb. 85).

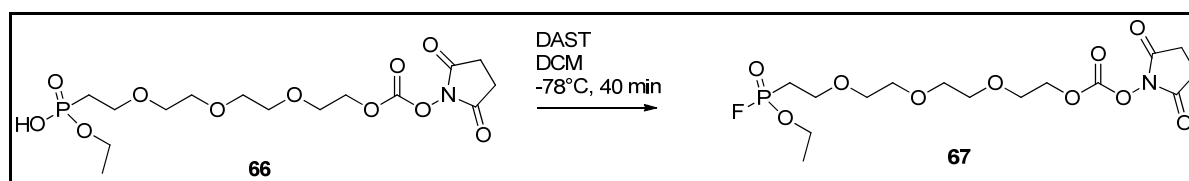


Abbildung 85: Fluorierung von **66** zu **67**.

Auch diese Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Kidd *et al.* durchgeführt,^[12] die Reaktionszeit allerdings wurde auf 40 min verlängert. Das Reagenz DAST wurde bei -78°C zugetropft. Nach Zugabe von DCM und H₂O wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase nochmals mit DCM extrahiert. Das hierbei erhaltene Produkt **67** wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

3.2.1.2.7 Einführung einer Dreifachbindung auf Stufe des Phosphorsäurederivates **66**

Als Alternativweg zur Darstellung der FP-PEG-Derivate wurde des Weiteren untersucht, inwiefern die Einführung der zur Darstellung von 2-Stufen ABPs notwendigen bzw. zur Darstellung von Fluorophor- oder Trifunktional-markierten ABPs eine Dreifachbindung auf der Stufe des Phosphorsäurederivates **66** Vorteile birgt.

Dementsprechend wurde Intermediat **66** auch mit Propargylamin umgesetzt (Abb. 86).

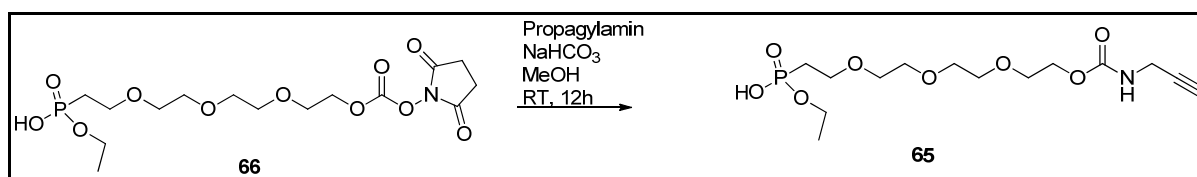


Abbildung 86: Einführung einer Dreifachbindung an **66**.

Diese Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Adam *et al.* durchgeführt.^[197] Die Reaktionszeit wurde nach DC-Kontrolle auf über 12 h verlängert. Das Lösungsmittel wurde nach Beendigung der Reaktion in einem N₂-Strom entfernt. Der verbliebene Feststoff wurde mit DCM versetzt und die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen, um das in DCM unlösliche NaHCO₃ nicht mit aufzunehmen. Anschließend wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule gereinigt, wobei das Produkt **65** in 59% erhalten werden konnte.

3.2.1.2.8 Einführung einer Dreifachbindung auf Stufe des Phosphonates **63**

Jedoch zeigte sich, dass die freie Säurefunktion in **66** die Aufarbeitung der Reaktion stark behinderte. Daher wurde die gleiche Reaktion noch einmal auf der Stufe des Phosphonates **63** durchgeführt (Abb. 87).

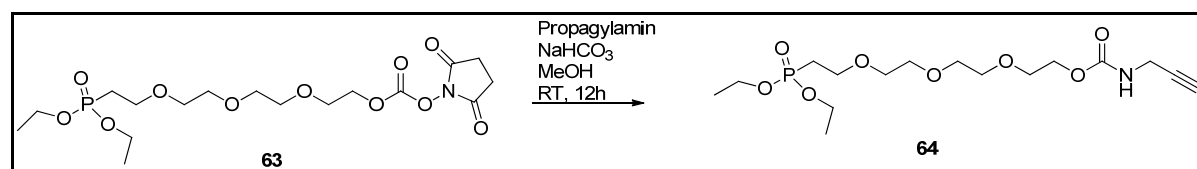


Abbildung 87: Reaktion von **63** mit Propargylamin zur Einführung der terminalen Dreifachbindung.

Auch diese Reaktion wurde analog zu der Vorschrift von Adam *et al.* durchgeführt.^[197] Das Lösungsmittel wurde nach Beendigung der Reaktion im Vakuum entfernt und das Rohprodukt direkt über eine Kieselgelsäule aufgereinigt.

Das Produkt **64** konnte nach dieser Reaktionsführung in einer Ausbeute von 80% erhalten werden.

3.2.1.2.9 Synthese des FP-PEG-Derivates **2** vom Phosphonat **64**

Zur Vorbereitung der Darstellung der Fluorophosphonateinheit wurde zuerst wiederum der Phosphonateser zum freien Phosphorsäure hydrolysiert (Abb. 88)

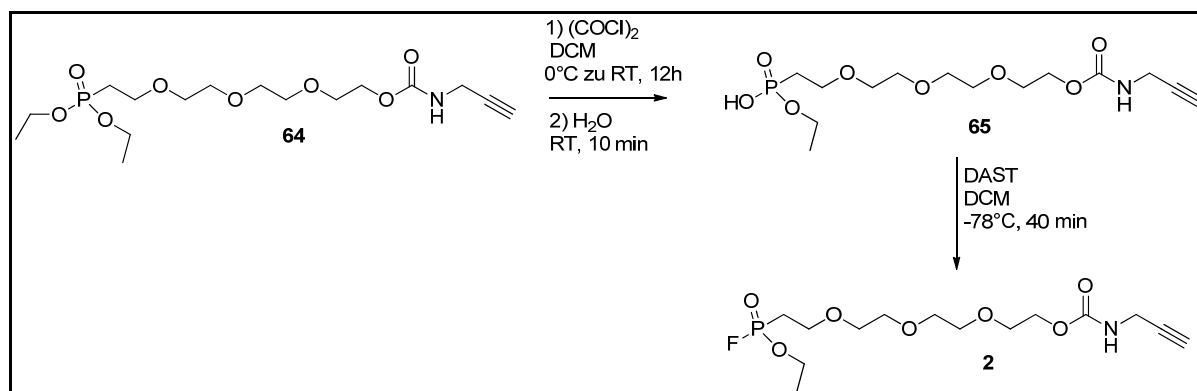


Abbildung 88: Hydrolyse des Phosphonatesters **64** und anschließende Fluorierung.

Auch hier wurde nach der Vorschrift von Kidd *et al.* vorgegangen.^[12] Oxalylchlorid wurde wiederum als 2M Lösung in DCM eingesetzt und bei 0°C zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel in einem N₂-Strom entfernt und anschließend Wasser zugegeben und 10 min gerührt. Um das Produkt **65** zu isolieren, wurde die Lösung dann mit DCM extrahiert, so dass das Produkt **65** in 59% Ausbeute isoliert werden konnte. Im nächsten Schritt wurde dann die Fluorierungsreaktion durchgeführt. Dazu wurde DAST bei -78°C zugetropft und 40 min gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im N₂-Strom entfernt wurde, wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule aufgereinigt. Somit konnte das gewünschte Produkt **2** in 62% Ausbeute erhalten werden. Zur Charakterisierung des Reaktionsproduktes wurden dabei nicht nur ¹H- und ¹³C-NMR Spektren aufgenommen, sondern diese durch ³¹P- und ¹⁹F-Spektren ergänzt, welche über eine Analyse der Kupplungskonstante des Signaldoublets die Darstellung eines Fluorophosphonates belegt. Da die Stabilität der Fluorophosphonate in Wasser nicht genau bekannt ist, diese aber für biologische Messungen essentiell ist, wurde die Probe des Weiteren auch einmal in D₂O gelöst und zu unterschiedlichen Zeiten ein ¹⁹F-NMR-Spektrum gemessen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das

Fluorophosphonat mindestens 3h bei pH 7 und RT in D₂O ohne nennenswerte Hydrolyse stabil bleibt.

3.2.2 Nitrophenolphosphonate

Nach der erfolgreichen Synthese der FP-PEG-Vergleichssubstanz sollten nun die benötigten Nitrophenolphosphonatsonden synthetisiert werden. Dazu wurde zunächst versucht, das Fluorophosphonat **2** als Ausgangsmaterial zu verwenden (Abb. 89).

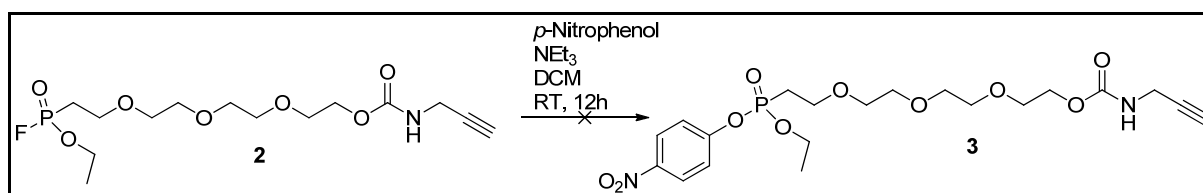


Abbildung 89: 1. Versuch zur Darstellung des Nitrophenolderivates **3**, ausgehend von **2**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Ghanem *et al.* durchgeführt,^[198] als Lösungsmittel wurde allerdings DCM verwendet, da sich das Fluorophosphonat **2** besser in DCM lösen ließ. Anschließend wurde das Lösungsmittel im N₂-Strom entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule aufgereinigt. Unerwarteterweise konnte jedoch kein Produkt **3** isoliert werden. Deshalb wurde ein Alternativweg eingeschlagen, in welchem die Darstellung über ein Chlorophosphonat erfolgen sollte (Abb. 90).

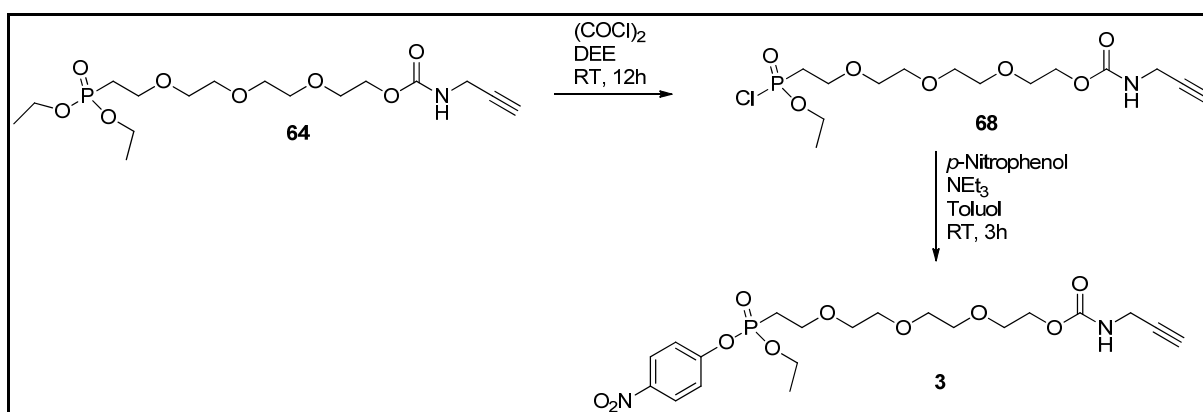


Abbildung 90: Chlorierung von **62** und Einführung des Nitrophenols.

Dementsprechend wurde **64** analog zur Vorschrift von Dijkstra *et al.* mit Oxalylchlorid umgesetzt.^[199] Als Lösungsmittel wurde Diethylether verwendet, da der vorher versuchte Einsatz von DCM nicht zum gewünschten Produkt führte. Bei dieser

Reaktionsführung konnte das Produkt **66** in 98% Ausbeute erhalten werden, wobei keine Aufarbeitung und auch keine Reinigung vorgenommen wurde. Stattdessen wurde das relativ instabile Intermediat **66** zügig mit *p*-Nitrophenol umgesetzt. Hierzu wurde *p*-Nitrophenol zusammen mit NEt₃ in Toluol gelöst und anschließend zu in Toluol gelöstem **68** gegeben. Das Lösungsmittel wurde im N₂-Strom entfernt und säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt **3** konnte somit in einer Ausbeute von 40% erhalten werden.

3.2.3 Diversifizierung der *p*-Nitrophenolphosphonat-Sonden: Austausch der Ethoxygruppe durch eine längere Alkoxygruppe (C₇)

Um chemisch-diversifizierte Sonden und somit Sonden mit unterschiedlicher Targetselektivität zu erhalten, wurden nun die ersten gerichteten Modifikationen durchgeführt. In einem ersten Schritt sollte hierzu ein Derivat mit einer längeren Alkoxygruppe am Phosphonat hergestellt werden (Abb. 91).

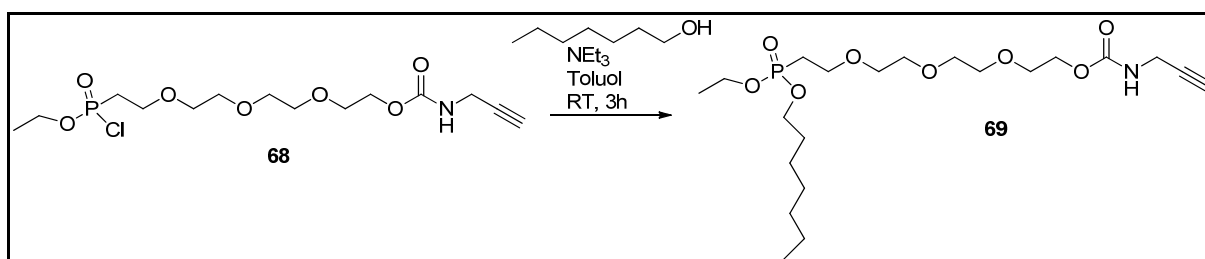
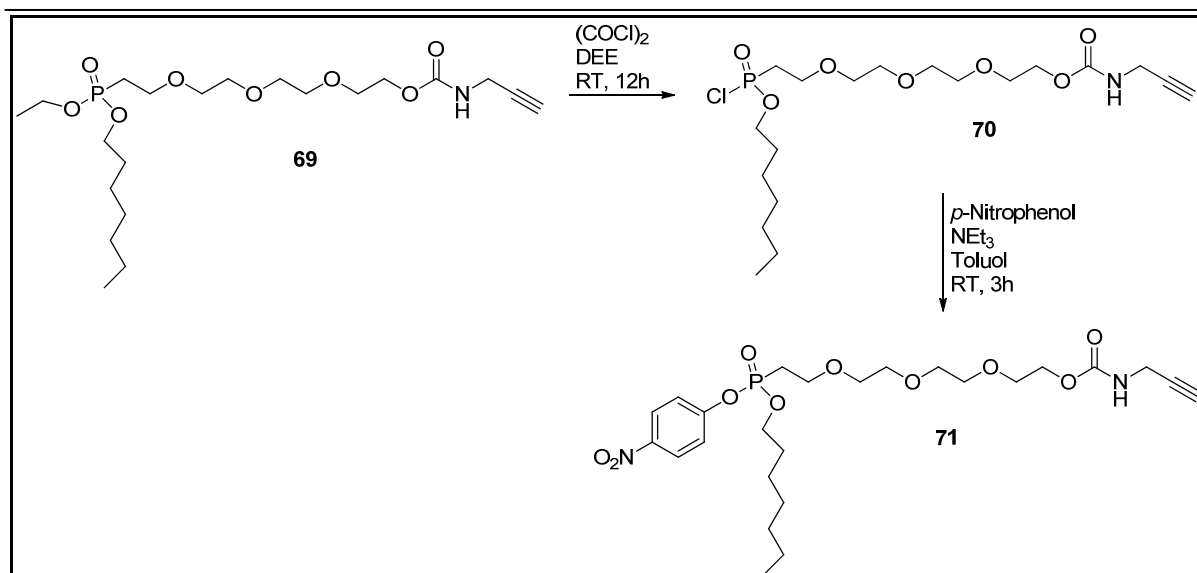
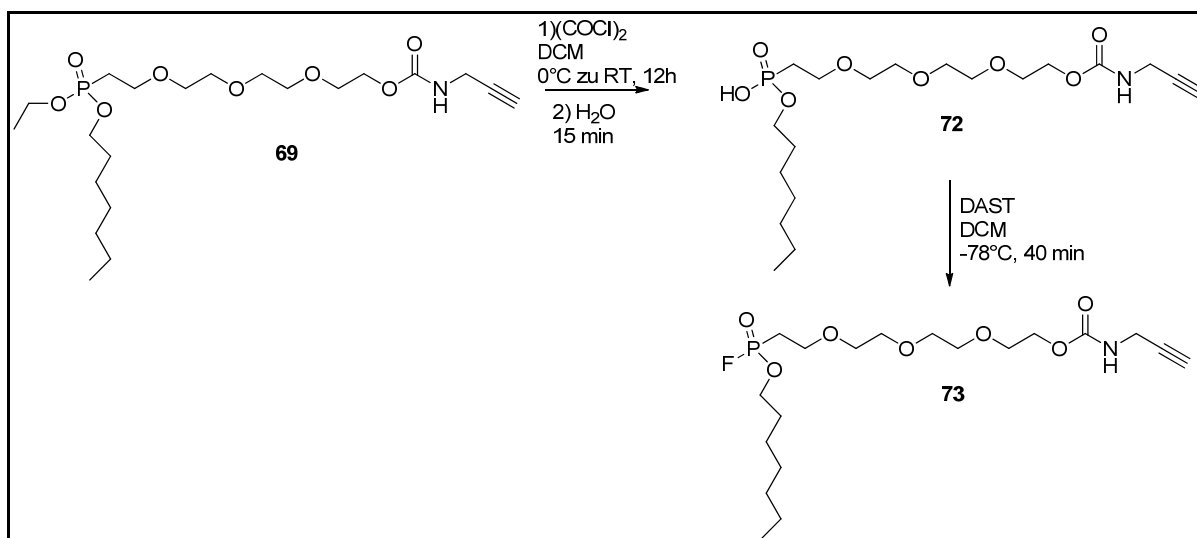


Abbildung 91: Reaktion von **68** mit Heptanol zu **69**.

Auch bei dieser Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Dijkstra *et al.* vorgegangen.^[199] Die Reaktionszeit betrug 3h, anschließend wurde die Reaktion in DCM aufgenommen und gewaschen. Nach einer Aufreinigung durch eine Kieselgelsäule konnte das Produkt **69** in 64% Ausbeute erhalten werden. Nach Einführung der Alkoxykette wurde nun sowohl eine Nitrophenolphosphonat als auch eine Fluorophosphonat-Sonde hergestellt (Abb. 92).

Abbildung 92: Chlorierung von **69** und Einführung der Nitrophenolgruppe.

Hierzu wurde zuerst ein Chlorphosphonat aus **69** hergestellt. Das Vorgehen wurde im Vergleich zu den oben beschriebenen Reaktionen nicht geändert.^[199] Es wurde nach Beendigung nur das Lösungsmittel entfernt und das Produkt **70** ohne weitere Analyse sofort in die folgende Reaktion eingesetzt. Das Produkt **71** konnte nach Aufarbeitung und Reinigung über eine Kieselgelsäule mit 22% Ausbeute erhalten werden. Somit war eine weitere Phosphonatsonde synthetisiert. Des Weiteren sollte nun eine entsprechende Fluorophosphonat-Sonde synthetisiert werden (Abb. 93).

Abbildung 93: Darstellung der Fluorophosphonatsonde **73**.

Auch hier wurden die schon bekannten Reaktionsbedingungen gewählt.^[12] Zunächst wurde mittelseiner 2M Oxalylchloridlösung das Chlorphosphonat hergestellt, welches unmittelbar durch Zugabe von Wasser zur freien Säure hydrolysiert wurde. Das Produkt wurde **72** wurde in 54% Ausbeute erhalten. Nun folgte die Fluorierung

mit DAST. Das Fluorophosphonat-Produkt **73** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 29% erhalten werden.

3.2.4 Darstellung von Nitrophenolphosphonat-basierten Sonden mit unterschiedlichen Seitenketten am Phosphor

Zur Diversifizierung der Nitrophenolphosphonat-Sonden sollten nun die geplanten Derivate mit unterschiedlichen Seitenketten am Phosphor generiert werden. Als reaktive Zwischenstufe zur Einführung der Derivatisierung sollte dabei die Chlorophosphonatstufe **68** verwendet werden (Abb. 94).

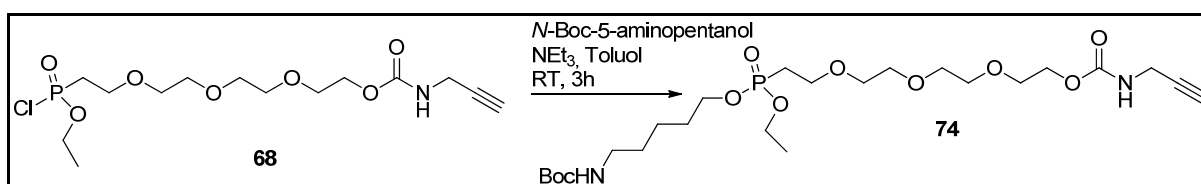


Abbildung 94: Einführung eines Boc-geschützten Aminoalkohols.

Zunächst sollte **68** mit einem Boc-geschützten Aminoalkohol umgesetzt werden. Hierzu wurde in einer Testreaktion *N*-Boc-5-aminopentanol verwendet. Als Reaktionsbedingungen wurden die oben beschriebenen Standardbedingungen angewendet.^[199] Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt **74** konnte in einer Ausbeute von 78% erhalten werden. Anschließend sollte nun die *p*-Nitrophenol-Abgangsgruppe am Phosphor eingeführt werden (Abb. 95).

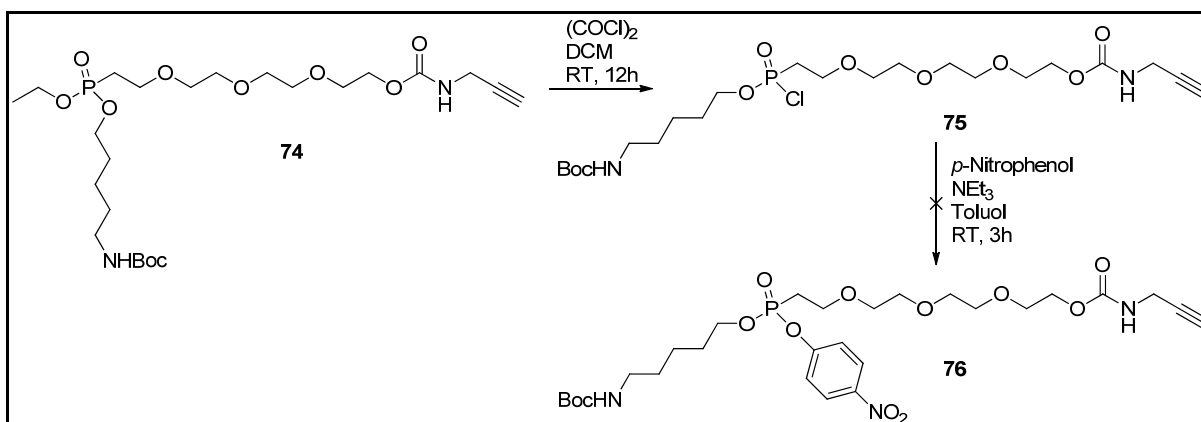


Abbildung 95: Chlorierung von **74** und anschließende Einführung des Nitrophenols.

Hierzu sollte wiederum zuerst ein Chlorophosphonat hergestellt werden, welches anschließend mit *p*-Nitrophenol umgesetzt werden sollte. Deshalb wurde eine Reaktion analog den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt.^[199] So wurde das Oxalylchlorid als konzentrierte Lösung bei RT zutropft und die Reaktion anschließend über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im N₂-Strom entfernt und das Produkt **75** ohne weitere Analyse sofort in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung über eine Kieselgelsäule gereinigt. Leider konnte jedoch bei dieser Reaktionsführung kein Produkt **76** isoliert werden.

Deshalb sollte in einem zweiten Versuch untersucht werden, ob zuerst eine Einführung der *p*-Nitrophenolgruppe und anschließende Umsetzung mit dem Boc-geschützten Aminoalkohol zum Produkt führen würde (Abb. 96).

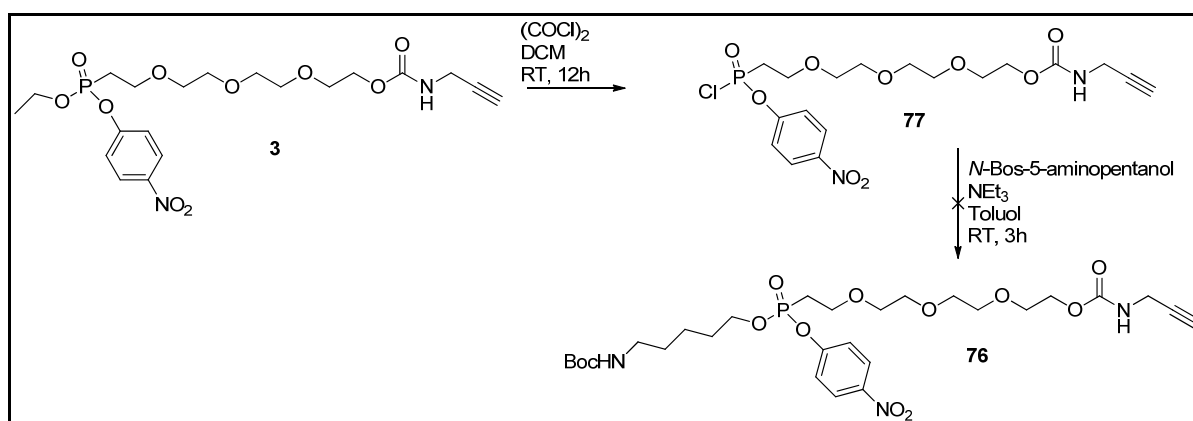


Abbildung 96: Versuchte Darstellung der Sonde **76** durch Chlorierung der *p*-Nitrophenolsonde **3** und anschließende Umsetzung mit dem Boc-geschützten Aminoalkohol.

Deswegen musste zuerst die *p*-Nitrophenolsonde **3** chloriert werden. Bei der Reaktion wurde, wie zuvor auch, eine konzentrierte Oxalylchloridlösung verwendet, die der Reaktionslösung bei RT zugegeben wurde. Das Lösungsmittel wurde nach Beendigung der Reaktion im N₂-Strom entfernt und das Produkt **77** ohne weitere Analyse im nächsten Reaktionsschritt mit *N*-Boc-5-aminopentanol umgesetzt. Hierzu wurde das Edukt **77** in Toluol gelöst und anschließend mit einer Lösung aus *N*-Boc-5-aminopentanol und NEt₃ in Toluol bei RT versetzt. Die Reaktionszeit betrug 3 h und das Lösungsmittel wurde anschließend in einem N₂-Strom entfernt. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule mit DCM/MeOH gereinigt. Jedoch konnte das gewünschte Produkt **76** wiederum nicht erhalten werden. Um jedoch trotzdem noch einen möglichen Zugang zu, in der Seitenkette Amino-funktionalisierten

Phosphonatsonden zu erhalten, sollte als nächstes ein Phthalimid-Derivat als an der Aminogruppe „geschütztes“ Aminoalkoholderivat verwendet werden (Abb. 97).

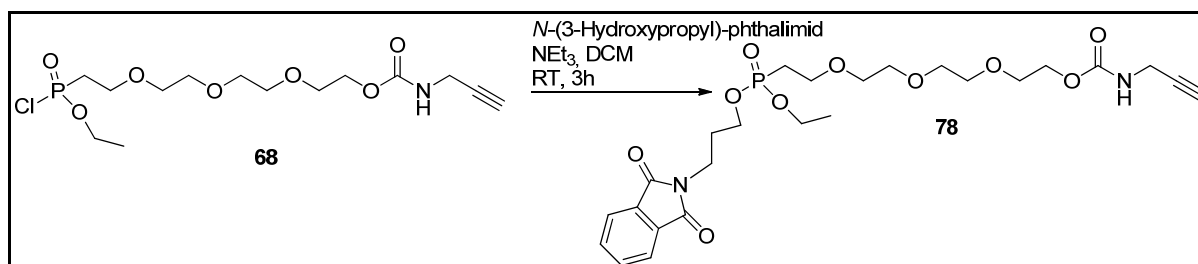


Abbildung 97: Einführung eines Phthalimidgruppe am Phosphonat von Verbindung **68**.

Auch hierzu wurde wieder die Vorschrift von Dijkstra *et al.* verwendet.^[199] Als Lösungsmittel wurde DCM verwendet, welches nach der Reaktion in einem N_2 -Strom entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule gereinigt und das Produkt **78** konnte mit einer Ausbeute von 63% isoliert werden. Nun musste noch das Nitrophenol eingeführt werden. Dazu wurde zuerst chloriert und anschließend mit *p*-Nitrophenol gekuppelt (Abb. 98).

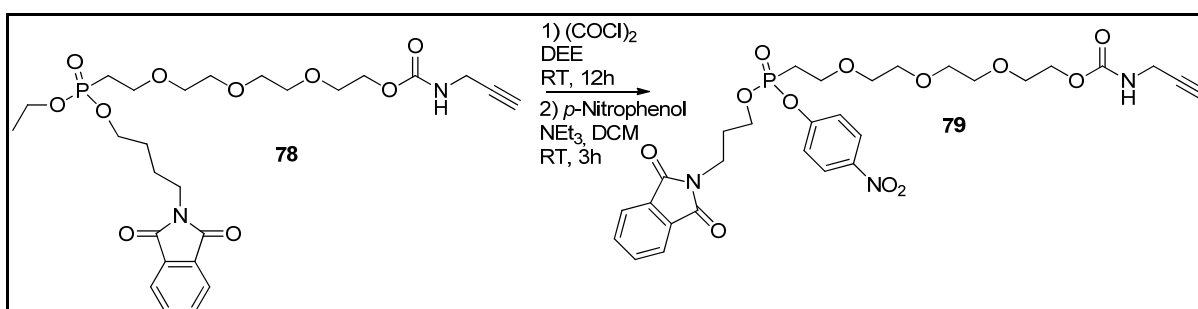


Abbildung 98: Chlorierung zur Darstellung eines Chlorophosphonates und anschließende Umsetzung mit *p*-Nitrophenol zur Sonde **79**.

Beide Reaktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Nach Beendigung der Chlorierungsreaktion wurde das Rohprodukt ohne Aufarbeitung und Reinigung direkt im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. Das Phthalimid-enthaltende Produkt **79** wurde dann zuerst über eine Kieselgelsäule mit einem Gemisch aus Chloroform und MeOH und zum anderen über eine RP-C18-Säule mit 60% Acetonitril in Wasser als Laufmittel gereinigt. Deshalb konnte das Produkt **79** nur mit einer Ausbeute von 8% erhalten werden. Zur weiteren Diversifizierung sollte als nächstes eine Pivalat-gruppierung (welche eine bekannte Prodrugform von Phosphonaten darstellt) am Phosphor eingeführt werden (Abb. 99).

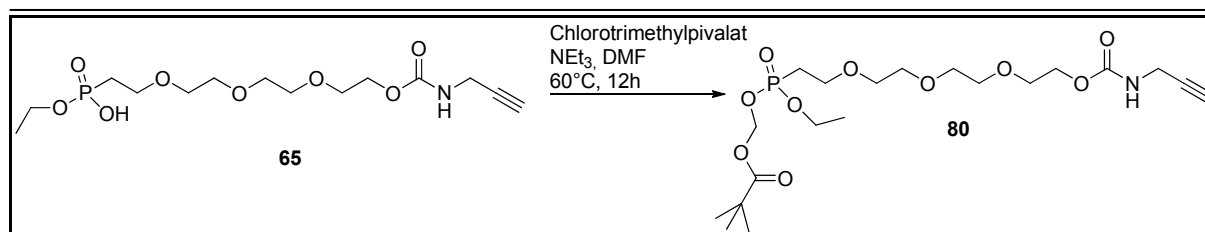


Abbildung 99: Einführung einer Pivalatgruppierung am Derivat **65**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Ortmann *et al.* durchgeführt.^[200] Hierzu wurde das Edukt **65** in DMF gelöst und für 5 min in Gegenwart von Triethylamin gerührt. Anschließend wurde Chloromethylpivalat zugegeben und die Reaktionsmischung auf 60°C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule gereinigt. Das Produkt **80** konnte in der geringen Ausbeute von 4% erhalten werden. Leider misslangten auch bei dieser Sonde alle weiteren Versuche, eine anschließende *p*-Nitrophenol-Gruppe am Phosphonat einzuführen.

Deshalb sollten jetzt Modifikationen auf einem anderen Weg eingeführt werden. Hierzu sollte von der *p*-Nitrophenolsonde **3** ausgegangen werden, welche in einem ersten Schritt mittels einer Alternativmethode in die freie Säure hydrolysiert werden sollte (Abb. 100).

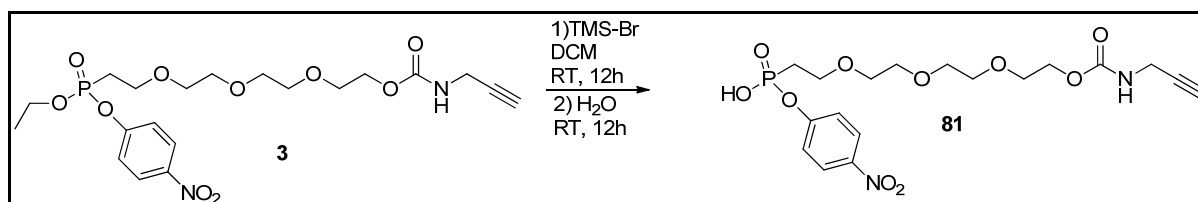


Abbildung 100: Hydrolyse der *p*-Nitrophenolsonde **3** zur freien Säure **81**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Ortmann *et al.* durchgeführt.^[201]^[200] Zuerst wurde hierzu das Edukt **3** mit TMS-Br versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, H₂O zugegeben und ebenfalls über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde extrahiert und eine Kieselgelsäule zur Aufreinigung vorgenommen. Das Produkt **81** konnte mit einer Ausbeute von 76% isoliert werden. Leider gelang es auch in weiteren Versuchen nicht, weitere funktionale Seitenketten an der freien Säure einzuführen. Deshalb wurde auf dieser Stufe entschieden, von der Darstellung weiterer Derivate zur Komplettierung der Phosphonatsonden-Bibliothek abzusehen und die insgesamt

synthetisierten 7 Sonden zuerst einmal auf ihre Anwendbarkeit in biologischen Systemen zu testen

3.2.5 Darstellung Biotin-funktionalisierter und trifunktionaler Phosphonatsonden

Nachdem nun eine Serie von Phosphonatsonden mit einem Alkinreporter synthetisiert wurden, sollten anschließend auch Derivate mit anderen Reportergruppen dargestellt werden. So sollten Biotin-derivatisierte Sonden hergestellt werden. Hierzu musste zuerst mit einer Aminogruppe funktionalisiertes Biotin hergestellt werden (Abb. 101).

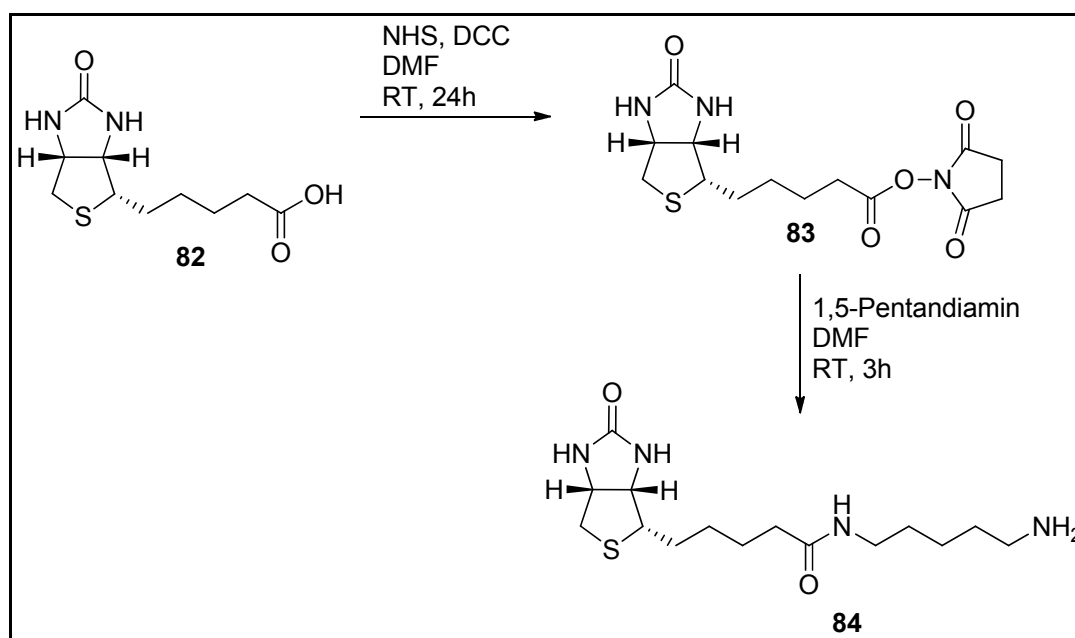


Abbildung 101: Modifizierung von Biotin (**82**) mit einem Pentandiamin liefert ein Aminofunktionalisiertes Biotin **84**.

Es wurde analog zur Vorschrift von Xuezhong *et al.* vorgegangen.^[201] Zunächst wurde die Säurefunktion des Biotin (**82**) als NHS-Ester voraktiviert. Dazu wurde als Kupplungsreagenz DCC verwendet. Das bei der Reaktion entstehende DCU wurde abfiltriert. Nach Umkristallisation wurde dann das Produkt **83** in 69% Ausbeute erhalten. Anschließend wurde dieses voraktivierte Biotinderivat **83** mit 1,5-Pentandiamin gekuppelt. Die Reaktion war nach 3h bei RT beendet, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Feststoff mit Ethanol gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum konnte das Produkt **84** mit 88% Ausbeute isoliert

werden. Anschließend wurde **84** mit der Fluorophosphonatsonde **67** gekuppelt (Abb. 102).

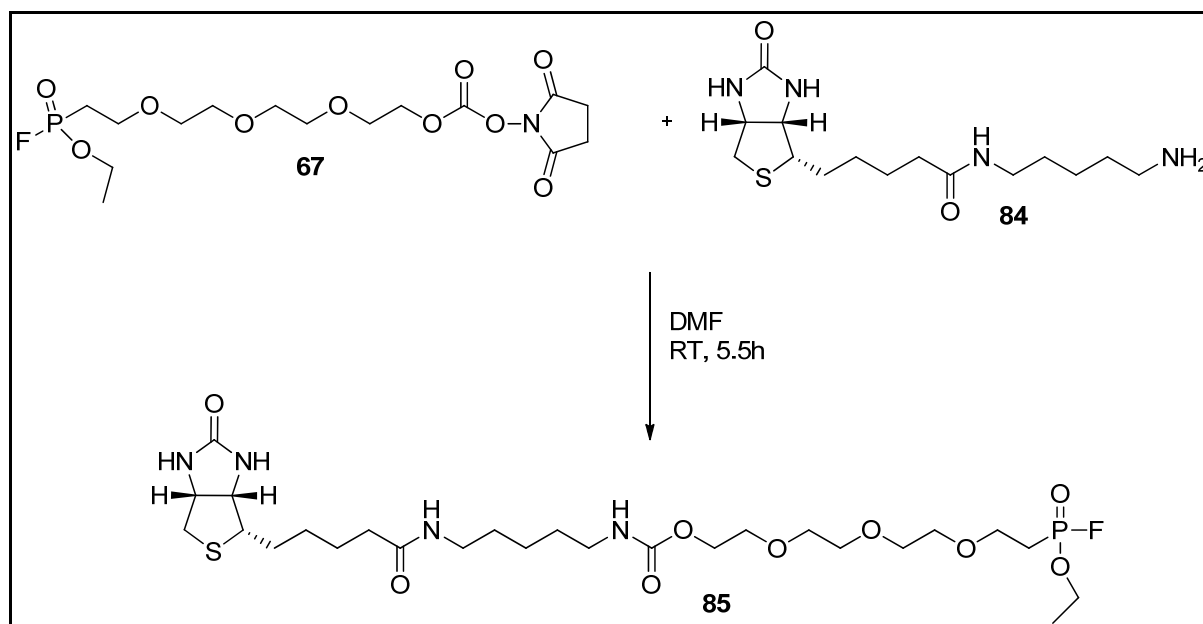


Abbildung 102: Kupplung von **67** mit **84** führte zum Biotin-Fluorophosphonat-Derivat **85**.

Da das Fluorophosphonat als NHS-Ester voraktiviert war, konnte auf Kupplungsreagenzien verzichtet werden, wie in der Vorschrift von Kidd *et al.* beschrieben.^[12] Die Reaktionszeit wurde etwas verlängert. Das Lösungsmittel DMF wurde nach Beendigung der Reaktion entfernt und der verbleibende Feststoff durch mehrmaliges Lösen in Chloroform, überführen der Flüssigkeit in ein sauberes Gefäß und entfernen des Lösungsmittels teilweise aufgereinigt und konnte somit schlussendlich in einer Ausbeute von 13% erhalten werden. Um nun auch eine trifunktionale Sonde zu erhalten, sollte als nächste die gleiche Strategie zur Kupplung mit dem käuflich-erhältlichen Biocytin-TMR (**86**) verwendet werden (Abb. 103).

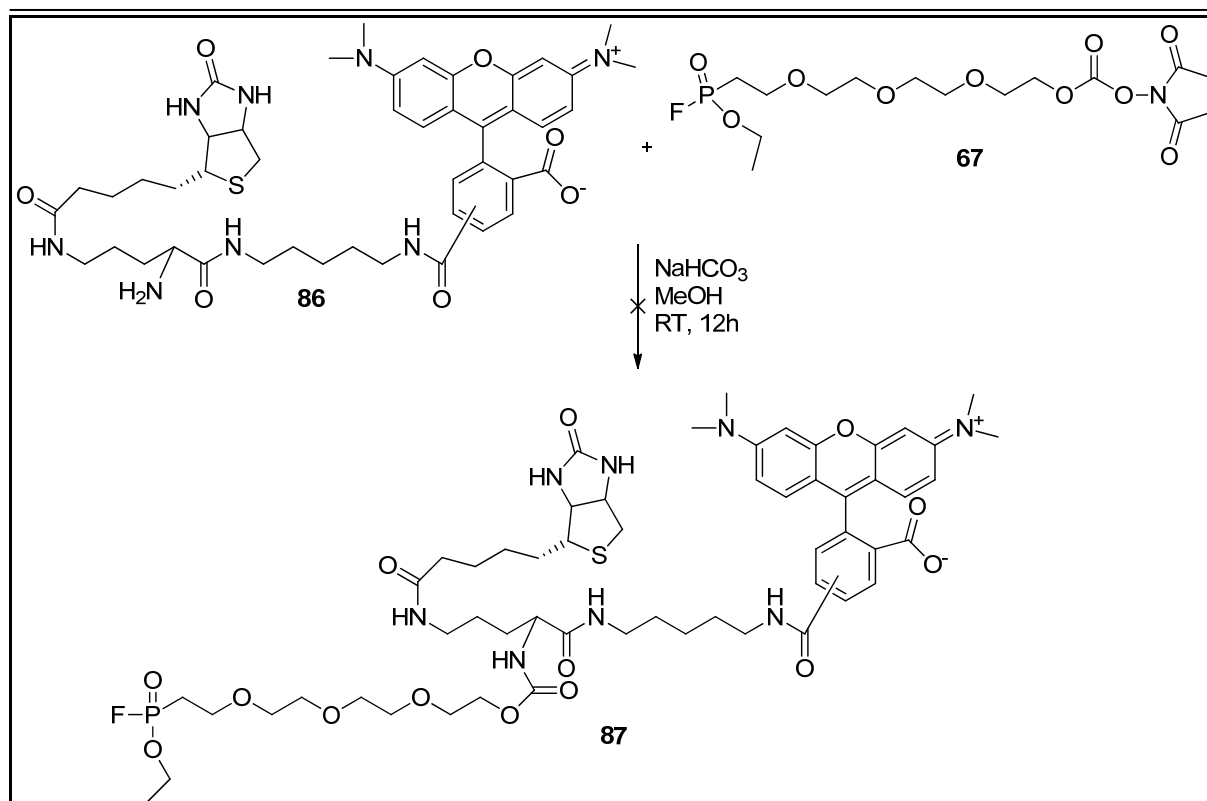
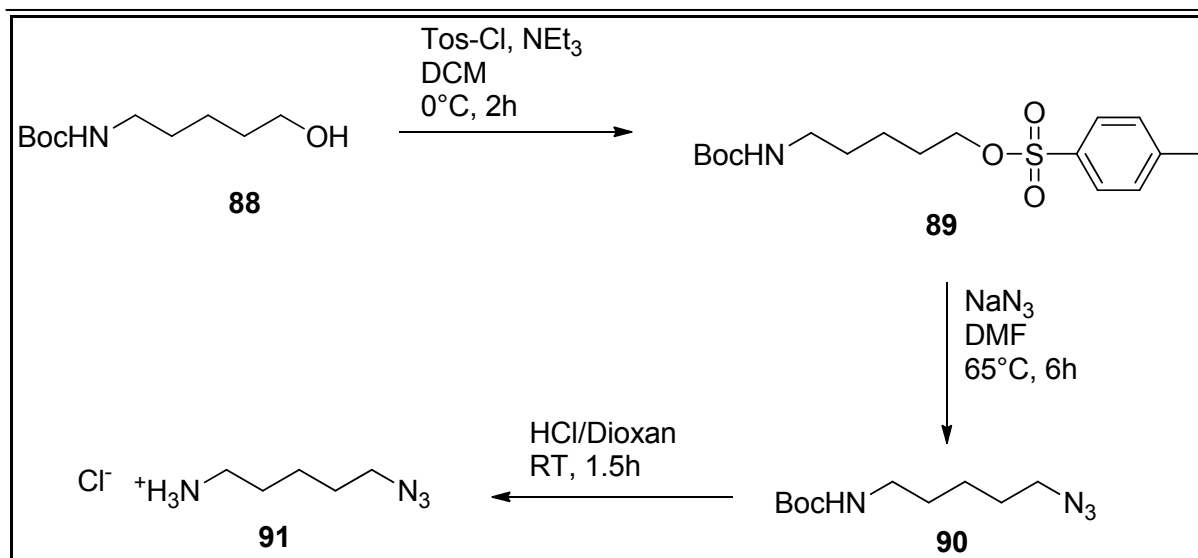


Abbildung 103: Kupplung von Biocytin-TMR (**86**) mit der aktivierten Fluorophosphonatsonde **67**.

Die Reaktion wurde analog zur Vorschrift von Adam *et al.* durchgeführt.^[197] Dabei wurde NaHCO₃ als Base verwendet. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule gereinigt. Leider konnte jedoch auf diesem Reaktionsweg kein Produkt **87** isoliert werden.

Deshalb sollte die trifunktionale Gruppe nun mittels einer Clickreaktion eingeführt werden. Hierzu mussten zuerst entsprechen Azid-funktionalisierte Biocytin-TMR-Derivat hergestellt werden. Es wurde zunächst ein Linker benötigt, der mit einem Azid versehen wurde. Die Synthese wurde analog zur Vorschrift von Clerc durchgeführt.^[202] Dementsprechend wurde eine Tosyl-Abgangsgruppe an einem Boc-geschützten Aminopentanalkohol eingeführt (Abb. 104).

Abbildung 104: Syntheseübersicht zur Darstellung des Azidlinkers **91**.

Die Reaktion wurde bei 0°C für 2h durchgeführt und das Produkt **89** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 60% Ausbeute erhalten werden. Nachfolgend wurde das Azid eingeführt, indem eine Reaktionslösung aus **89** und NaN₃ in DMF für 6 h bei 65°C gerührt wurde. Nach Aufarbeitung konnte das Produkt **90** ohne Reinigung in 91% erhalten werden. Im letzten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt. Hierzu wurde eine 4N HCl-Lösung in Dioxan verwendet. Nach der Reaktionszeit von 1.5 h wurde noch für 30 min N₂ durch die Lösung geführt und das Lösungsmittel anschließend fast vollständig im Vakuum entfernt. Das verbliebene Lösungsmittel wurde durch Zugabe von flüssigem Stickstoff ausgefroren und im Vakuum anschließend lyophilisiert. Das als HCl-Salz vorliegende 5-Azidopentan-1-amin (**91**) wurde somit in 77% Ausbeute erhalten. Nach erfolgreicher Synthese des Linkers konnte dieser nun mit dem Fluorophor Rhodamin bzw. Biotin (**82**) gekuppelt werden. Dazu wurde Rhodamin-succinimid (**92**) bzw. Biotin (**82**) als Ausgangsmaterialien verwendet (Abb. 105).

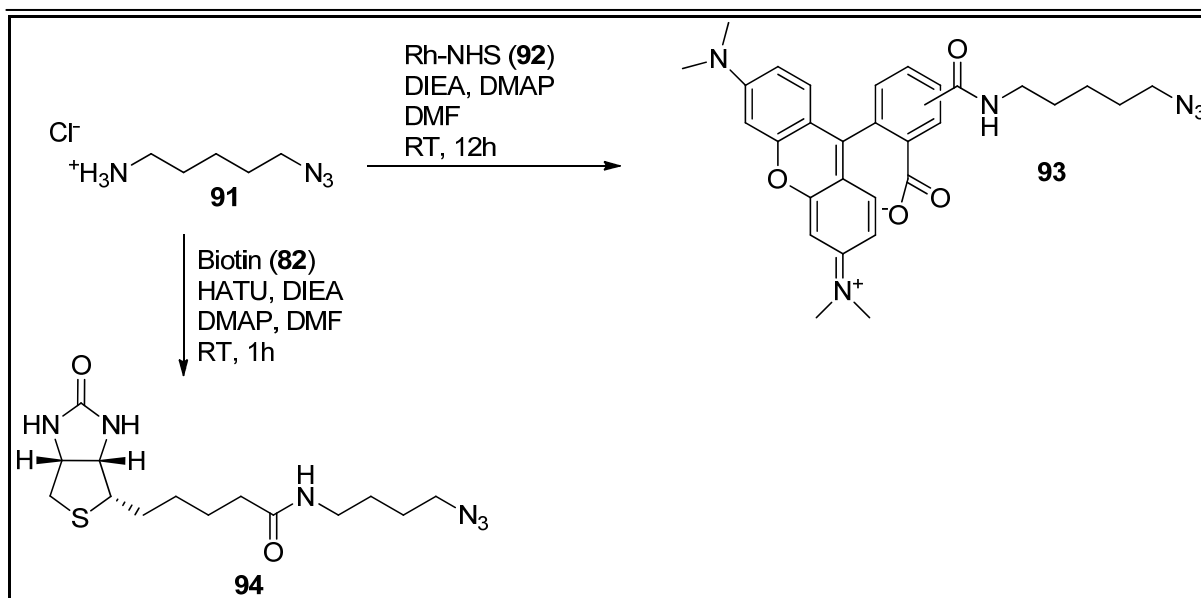
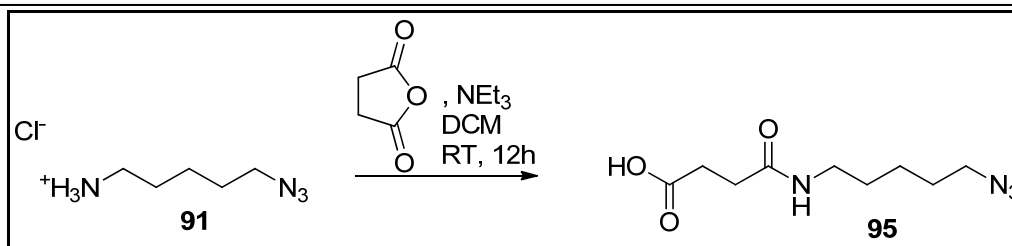


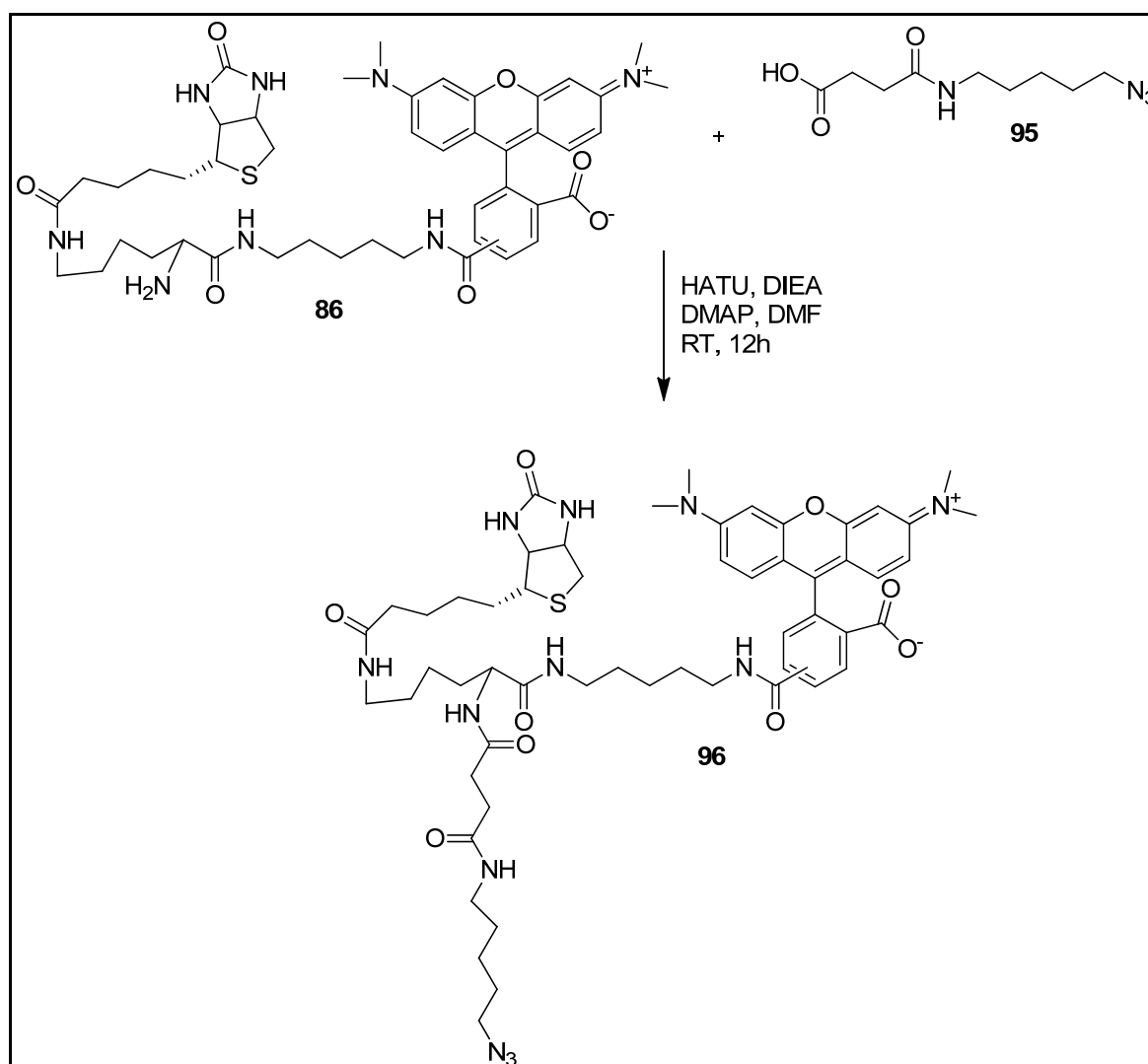
Abbildung 105: Kupplung von Rhodamin-succinimid (**92**) bzw. Biotin (**82**) mit **91**.

Die Kupplungen wurden nach der Vorschrift von Clerc durchgeführt.^[202] Zur Darstellung des Rhodaminreporters wurde ein käuflich erhältliches, Hydroxysuccinimid-aktiviertes Rhodaminderivat eingesetzt. Aus diesem Grund konnte auf ein Kupplungsreagenz verzichtet werden. Die Reaktion wurde bei RT über Nacht durchgeführt, anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und zur Reinigung eine Kieselgelsäule durchgeführt. Das Produkt **93** konnte in 40% Ausbeute erhalten werden. Zur Darstellung des Biotinreporters wurde Biotin (**80**) mit dem Kupplungsreagenz HATU aktiviert. Die Reaktionszeit betrug 1h und es konnte bei RT gearbeitet werden. Auch hier wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule gereinigt. Das Produkt **94** konnte in 30% Ausbeute erhalten werden.

Für die Darstellung der trifunktionalen Sonden wurde Biocytin-TMR (**86**) verwendet, welches käuflich erworben wurde. Da das Biocytin-TMR (**86**) eine freie NH_2 -Gruppe aufweist, musste der oben beschriebene Linker zunächst mit einer Säurefunktion versehen werden, um eine anschließende Kupplung durchführen zu können (Abb. 106).

Abbildung 106: Einführen einer Säurefunktion am Linker **91**.

Es wurde nach der Vorschrift von Gur'eva *et al.* vorgegangen.^[203] Die Reaktion wurde bei RT über Nacht durchgeführt, anschließend wurde mit 5%iger NaOH aufgearbeitet und die Phasen getrennt. Nach Extraktion wurde die wässrige Phase angesäuert und erneut extrahiert, um das nun protonierte Rohprodukt zu erhalten. Das Produkt **95** konnte nach Kieselgelsäule in einer Ausbeute von 80% erhalten werden. Die anschließende Kupplung mit Biocytin-TMR (**86**) wurde analog zur Vorschrift von Clerc durchgeführt (Abb. 107).^[202]

Abbildung 107: Kupplung von **95** mit Biocytin-TMR (**86**) führte zum trifunktionalen Reporter **96**.

Auch hier wurde als Kupplungsreagenz wieder HATU verwendet, als Lösungsmittel wurde jedoch MeOH eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine RP-C18-Kieselgelsäule gereinigt. Das Produkt **96** konnte in einer Ausbeute von 80% erhalten werden.

Die so dargestellten Reportergruppen wurden dann mit ausgewählten Phosphonatsonden gekuppelt. Zuerst erfolgte die Darstellung einer trifunktionalen Phosphonatsonde (Abb. 108).

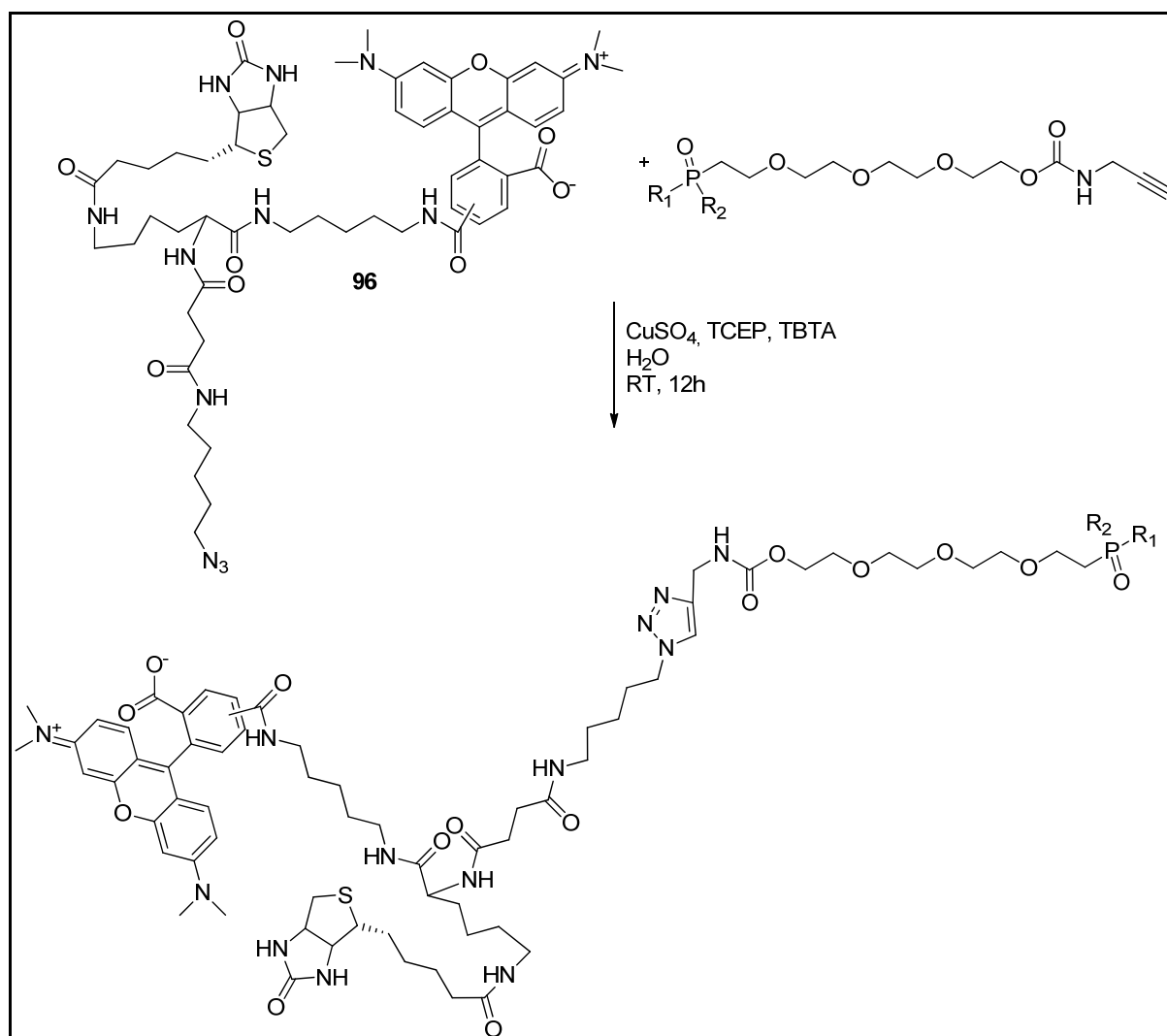


Abbildung 108: Übersicht zur verwendeten Clickreaktion zur Darstellung der trifunktionalen Sonden.

Für die benötigte Clickreaktionen wurden stets die gleichen Bedingungen gewählt, welche der Vorschrift von Speers *et al.* entnommen wurden.^[42] Hierzu wurden Stammlösungen von CuSO_4 (50mM in H_2O), TCEP (50mM in H_2O) und TBTA (100mM in DMSO) hergestellt, die dann zur Reaktionslösung gegeben wurden. In den ersten Versuchen wurden Na-ascorbat anstelle von TCEP eingesetzt, allerdings

ohne großen Erfolg. Als Lösungsmittel wurde Wasser verwendet und die Reaktionen wurden bei RT unter Lichtausschluss über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Rohprodukte über eine RP-C18-Kieselgelsäule aufgereinigt. Währenddessen die Fluorophosphonate sich unter diesen Reaktionsbedingungen zersetzten, konnten für die *p*-Nitrophenolsonden die entsprechenden Produkte erhalten werden (Abb. 109).

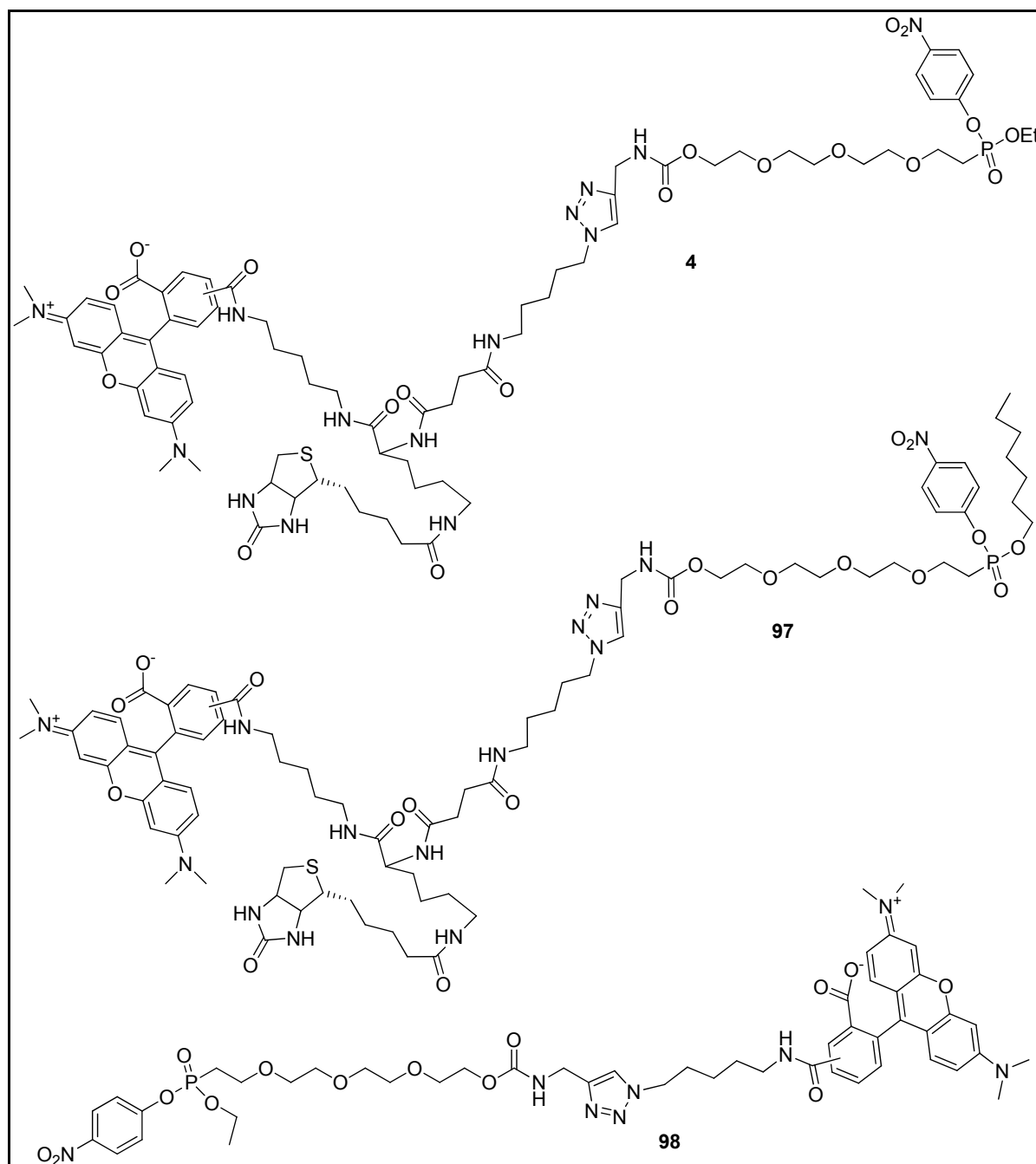


Abbildung 109: Übersicht über die erfolgreich synthetisierten Sonden.

Die trifunktionale *p*-Nitrophenolphosphonatsonde **4** konnte in einer Ausbeute von 29% erhalten werden, die Sonde mit dem Heptanlinker am Phosphonat **97** mit 16%

Ausbeute und das Rhodamin-*p*-Nitrophenolphosphonat **98** mit 22% Ausbeute. Da sowohl das Rhodamin-succinimid (**93**) als auch das Biocytin-TMR (**86**)-Ausgangsmaterial als Mischung von 5- und 6-substituierten Isomeren eingesetzt wurde, konnten die Produkte im LC-MS jeweils als zwei Produkte detektiert werden, eine entsprechende Isomerentrennung im säulenchromatographischen Schritt war jedoch nicht möglich.

3.2.8 Evaluierung der Einsatzmöglichkeiten der Phosphonatsonde **4**

Zunächst wurde die trifunktionale *p*-Nitrophenolsonde (Tri-NP) **4** auf Anwendbarkeit getestet. Dazu wurde zunächst ein Experiment zur Bestimmung des Zielproteins von **4** durchgeführt. *Arabidopsis thaliana*-Blattextrakte wurden mit Paraoxon (100 µM) bzw. DMSO als Negativkontrolle für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde ein Markierungsexperiment (1 h) mit der sehr reaktiven Breitband-Serinhydrolasesonde FP-Rh (2 µM) bzw. mit Tri-NP **4** (2 µM) durchgeführt (Abb. 110).^[204]

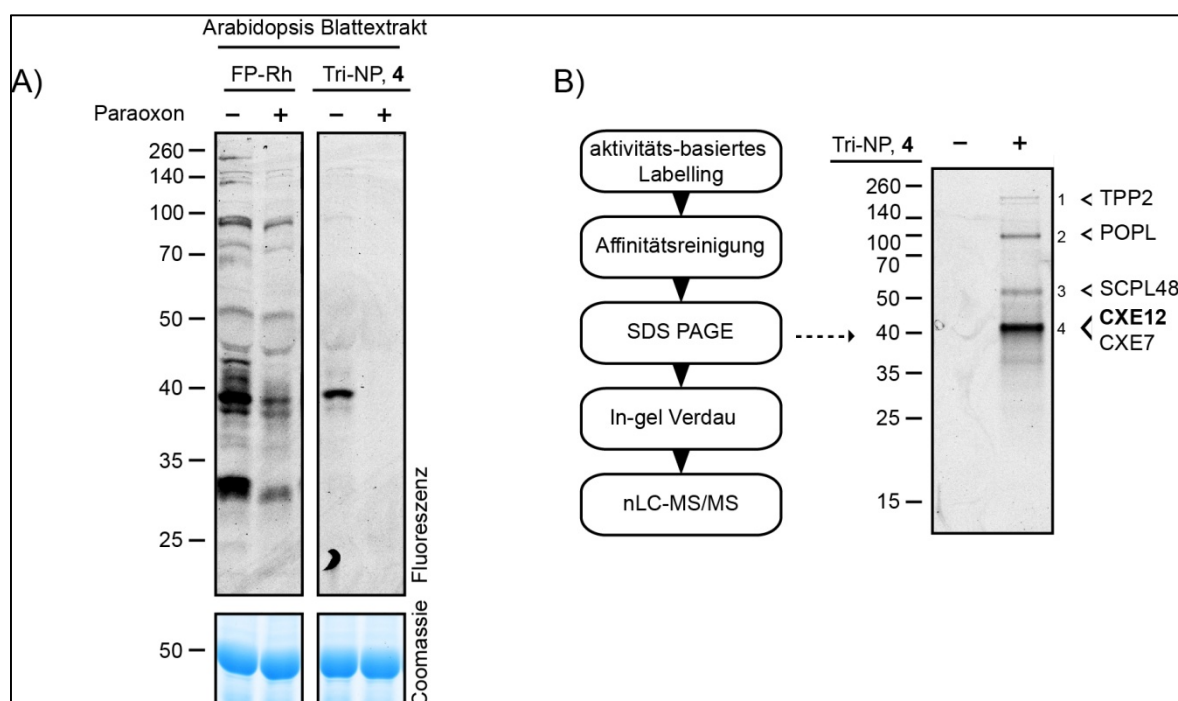


Abbildung 110: Ergebnisse des Labelingexperimentes (A) und der Affinitätsaufreinigung (B).^[204]

Die FP-Rh-Sonde ist als sehr potente Sonde für Serinhydrolasen bekannt, was sich auch in dem Experiment beobachten ließ. Es wurden sehr viele Zielproteine gefunden. Die Vorinkubation mit Paraoxon ergab ein verändertes Bandenmuster. Besonders im Bereich rund um die 40 kDa Markierung waren einige Banden verschwunden. Dies deutete darauf hin, dass Paraoxon spezifisch mit diesen

Proteinen interagiert hat. Das Markierungsexperiment mit Tri-NP **4** ergab eine starke Bande um 40 kDa, die sensitiv gegenüber Paraoxon ist. Es konnte also eine selektivere Sonde gegenüber FP-Rh hergestellt werden. Da die Interaktion mit Paraoxon unterdrückt werden kann, kann ein unspezifisches Verhalten der Sonde aufgrund des Linkers und des Reporters ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt wurden die Zielproteine von Tri-NP **4** identifiziert. Dazu wurde ein *Arabidopsis thaliana*-Blattextrakt mit der Sonde inkubiert und eine Affinitätsaufreinigung über Avidinbeads vorgenommen (wie in 3.1.5 beschrieben). Nach der Elektrophorese wurden markierte Proteine durch Auslesen der Fluoreszenz sichtbar gemacht und im Gel tryptisch verdaut. Die gewonnenen Peptide wurden dann mittels NanoLC-ESI-MS/MS identifiziert und nach Datenbankabgleich dem Hauptprotein CXE12 (Carboxylesterase 12) zugeordnet. Zudem konnten noch die Serinhydrolasen TPP2 (Tripeptidylpeptidase 2), POPL (Polyoligopeptidase-ähnliche), SCPL48 (Serincarboxylpeptidase 48) und CXE7 (Carboxylesterase 7) identifiziert werden. Da es im Bereich um 30 kDa Banden gibt, die sensitiv auf Paraoxon reagieren, allerdings in der Markierung mit Tri-NP **4** in diesem Bereich nichts zu sehen war, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem der Reporter erst nach der eigentlichen Markierung via Clickchemie eingeführt wurde.^[204]

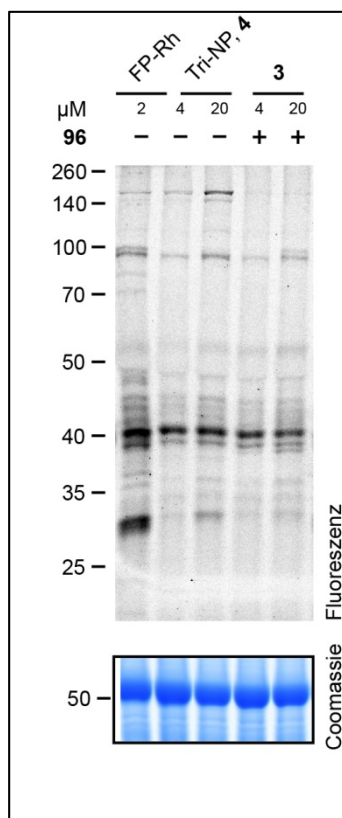


Abbildung 111: Gelbild des Experimentes mit Clickchemieansatz.^[204]

Dazu wurde *Arabidopsis thaliana*-Blattextrakt mit FP-Rh, Tri-NP **4** und der Sonde **3** jeweils bei zwei verschiedenen Konzentrationen (4 μ M und 20 μ M) für 1 h inkubiert und anschließend die Clickchemie-Reagenzien zugegeben (TBTA (100 μ M), TCEP (2 mM) und CuSO_4 (1 mM)). Es wurde eine weitere Stunde inkubiert und anschließend mit Gelladungspuffer die Reaktion gestoppt. Eine Gelelektrophorese zur Auftrennung wurde durchgeführt und durch In-Gel-Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 111). Das zu erkennende Bandenmuster ist dem des Tri-NP's **4** sehr ähnlich. Nur TPP2 wurde weniger effizient markiert, was allerdings an der generell niedrigeren Markierungseffizienz aufgrund der Clickchemie zurückzuführen ist. Es wird also davon ausgegangen, dass Tri-NP **4** eine höhere Selektivität aufweist als FP-Rh, was zum einen am Austausch der Abgangsgruppe liegen könnte, aber auch an dem Austausch der Linkerregion (von einer Alkankette zu einer PEG-Kette). Damit die Markierung von CXE12 durch das Tri-NP **4** bestätigt werden konnte, wurde anschließend ein Markierungsexperiment mit CXE12 durchgeführt, das transient in *Nicotiana benthamiana* überexprimiert wurde (Abb. 112).^[204]

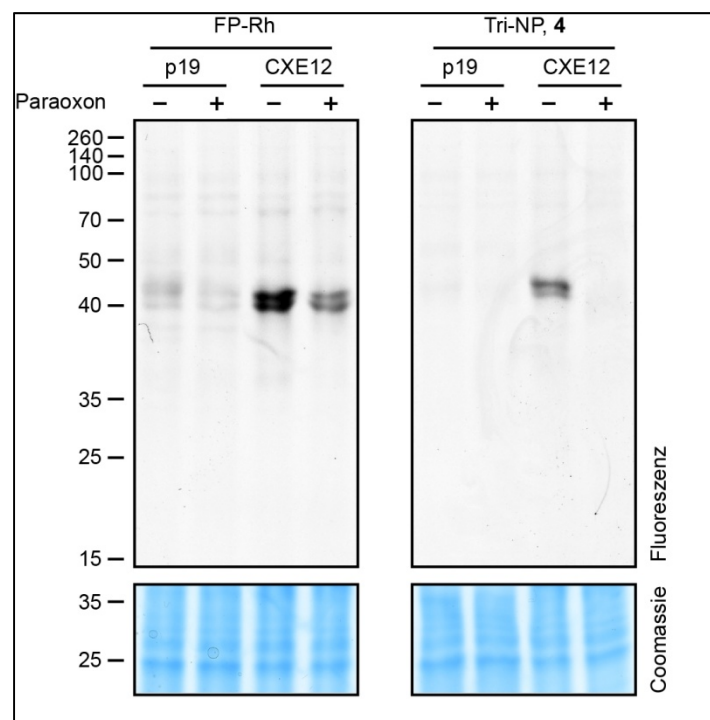


Abbildung 112: Agroinfiltrationsexperiment.^[204]

Dieses Experiment belegte, dass CXE12 das tatsächliche Zielprotein von Tri-NP **4** ist.^[204]

3.2.9 Biologische Experimente zur Phosphonatsondenbibliothek

Die Sondenbibliothek, die hergestellt wurde, sollte zunächst auf ihre Wirksamkeit in Pflanzenzellen getestet werden. Dazu wurde eine *Arabidopsis thaliana*-Zellkultur mit den Sonden für 2 h inkubiert. Es wurde das synthetisierte FP **2**, die Nitrophenolsonde **3** und die Proben **65**, **71**, **73**, **79**, **80** und **81** verwendet. Als Standardpositivkontrolle wurde das FP mit der Alkankette verwendet („Gold Standard“), welches hier ebenfalls als Clicksonde mit einer endständigen Dreifachbindung eingesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mehrmals mit frischem Medium gewaschen. Die Zellen wurden vollständig vom Medium befreit und bis zur Weiterbenutzung in flüssigen Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde die Zellen aufgeschlossen und die Clickreaktion (wie in 3.1.5 beschrieben) durchgeführt (Abb. 113).

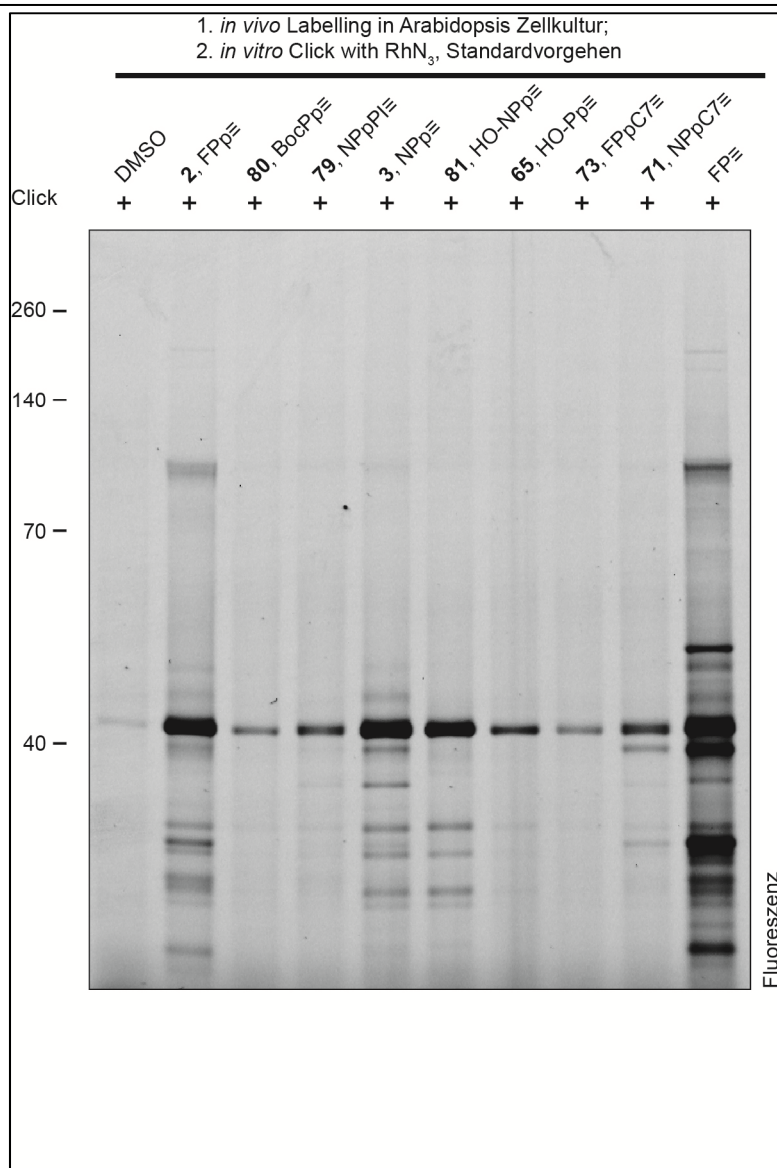


Abbildung 113: Fluoreszenzgelbild zur Überprüfung der Labelling-Effizienz der einzelnen Phosphonatsonden (aufgenommen von Herrn Dr. Farnsach Kaschani).

Man kann erkennen, dass die FP-Probe **2** mit der PEG-Kette als Linker ein etwas schwächeres Bandenmuster aufweist, als die Literatur bekannte Sonde mit der Alkankette. Zudem konnte bei der Pivalatsonde **80**, bei der Probe **65** und bei der FP-Sonde mit der C7-Kette am Phosphor (**73**) kein auswertbares Bandenmuster erkannt werden. Die anderen Sonden zeigen ein der FP-Sonde vergleichbares, teilweise spezifischeres Bandenmuster. Dieses Experiment zeigt, dass sich die neu-entwickelten Sonden gut für den Einsatz *in vivo* eignen.

Um weitere Einsatzgebiete für die Sonden zu prüfen, haben wir in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Bettina Siebers an der Universität Duisburg-Essen das Verhalten thermophiler *Archaea*-Bakterien in einem ersten Experiment gegenüber den Sonden getestet. Die *Archaea*-Bakterien wurden mit den Komponenten der

Sondenbibliothek inkubiert und anschließend für 30 min auf unterschiedliche Temperaturen erhitzt (Abb. 114).

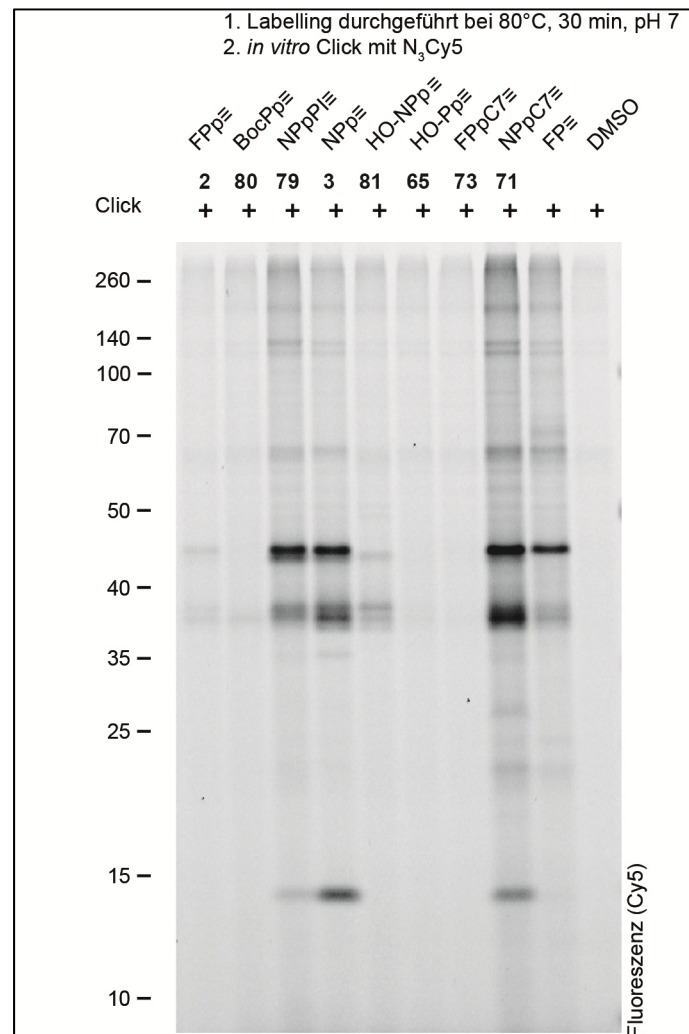


Abbildung 114: Experiment mit thermophilen Archaea-Bakterien (zusammen mit Dr. Farnusch Kaschani).

Hier ist exemplarisch die Temperatur 80 °C dargestellt, bei der thermophile *Archaea*-Bakterien am besten wachsen und leben. Auch hier können deutlich Bandenmuster der unterschiedlichen Sonden erkannt werden. Die FP-Sonde **2** zeigt eine schwächere Aktivität als die NP-Sonde **3**, ebenso die Sonde **81**. Keine Aktivität kann bei der Sonde **65**, **73** und **80** beobachtet werden. Dieses Experiment belegt somit die generelle Anwendbarkeit der Sonden zum Profiling von Serinhydrolasen in *Archaea*-Bakterien. In einem zweiten Schritt sollen diese nun *in vivo* getestet werden, da bei solchen Experimenten die im Organismus-vorkommenden Aktivitätsmuster „realitätsnäher“ abgebildet werden können.. Wir hoffen, über diese Experimente Aufschluss über die Aktivität von Serinhydrolasen in diesen noch nicht besonders gut verstandenen Organismen gewinnen zu können.

4. Zusammenfassung

In der chemischen Proteomik werden niedermolekulare Substanzen als chemische Sonden verwendet, um gezielt und nach Möglichkeit in biologisch-relevanter Weise einzelne Proteine des Proteoms für eine tiefergehende Analyse auszuwählen. Die chemische Proteomik ermöglicht somit, die Komplexität Proteom-weiter Messungen auf funktionell-relevante Proteine zu reduzieren. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist jedoch durch die Verfügbarkeit geeigneter Sonden limitiert. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb das verfügbare Repertoire durch chemische Darstellung und Evaluierung neuer chemischer Sonden erweitert. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze realisiert:

Im ersten Ansatz wurde der Naturstoff Callysponginsäure (1) als mögliche chemische Sonde evaluiert. Dieser Naturstoff gehört zur Klasse der Polyacetylene und verfügt über eine terminale Alkingruppe, welche als Reportereinheit in chemischen Proteomik-Anwendungen dienen kann. Hierzu wurde zuerst eine Totalsynthese des Naturstoffes etabliert; diese erstmalige Synthese von Callysponginsäure (1) ermöglichte nicht nur die Bereitstellung der für die weitergehenden Untersuchungen notwendigen Substanzmengen, sondern bestätigte auch die chemische Struktur (inkl. Konfiguration) des Naturstoffes. In ersten Studien konnte anschließend die prinzipielle Verwendbarkeit des Naturstoffes zur Markierung einzelner Proteine des Proteoms nachgewiesen werden.

Im zweiten Ansatz wurden *p*-Nitrophenolphosphonatderivate als chemische Sonden für das aktivitätsbasierte Protein Profiling (ABPP) hergestellt und auf Anwendbarkeit evaluiert. Die ABPP ist eine besondere Methode der chemischen Proteomik, in welcher aktivitätsbasierte Sonden (ABP) zur Messung der Aktivitätszustände von Enzymen verwendet werden. Dabei sollten zielgerichtet chemische Sonden für eine Anwendung in Pflanzen bzw. *Archaea*-Bakterien entwickelt werden. So wurde im Rahmen der Arbeit – ausgehend von der bekannten Wechselwirkung des Wirkstoffes Paraoxon – eine hochselektive, aktivitätsbasierte Sonde für die Carboxylesterase CXE12 in *Arabidopsis thaliana* entwickelt. Des Weiteren wurde eine Bibliothek an *p*-Nitrophenolphosphonatsonden generiert, welche zum ABPP von *Archaea*-Bakterien eingesetzt werden können.

5. Experimenteller Teil

5.1 Generelle Methoden und Instrumente

Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von Acros, Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Navobiochem, Riedel de Haen, Iris und Roth bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die trockenen Lösungsmittel wurden in der höchsten Qualität von denselben Anbietern verwendet. Bei Reaktionsführung unter Schutzgas wurde Argon verwendet.

Zur Reinigung über Kieselgelsäule wurde Kieselgel von Acros (Partikelgröße 35 – 70 μm) und Fluka (Partikelgröße 35 – 75 μm) oder LiChroprep RP-18 von Merck (Partikelgröße 40 – 63 μm) verwendet. Für die Dünnschichtchromatographie kamen DC-Kieselgelplatten von Merck (60 F₂₅₄, und 60 RP-18 F_{254S}, auf Aluminiumfolie, 20x20 cm) zum Einsatz. Zum Anfärben der DC-Platten wurde Seebachlösung (20 wt% in EtOH) oder KMnO₄-Lösung (in H₂O) verwendet, oder die Spots wurden unter UV-Licht bei 254 nm oder 366 nm sichtbar gemacht. Die ermittelten R_F-Werte und Lösungsmittelgemische sind den einzelnen Versuchen zu entnehmen.

Die NMR-Spektren wurden an einem Varian Mercury 400-MHz System, einem Bruker Avance DRX 500 MHz System oder einem Varian Unity Inova 600 MHz System sowie einem 400-MHz FT-NMR Avance II™ der Firma Bruker oder einem 700-MHz Fourier-NMR Avance II™ der Firma Bruker durchgeführt. Die ¹H-NMR-Spektren werden wie folgt angegeben: chemische Verschiebung (δ) in ppm, bestimmt nach dem undeuterten Lösungsmittelsignal, Multiplizität (s – Singulett, d – Dublett, t – Triplett, dt – Dublett von Triplett, q – Quartett, td – Triplett von Dublett, m – Multiplett), Kupplungskonstante (J) und Anzahl der Protonen (H).

Die LC-MS Spektren wurden an einem HPLC-System der Firma Agilent Technologies (1200 Serie) mit einer Eclipse XDB-C18-Säule (Partikelgröße 5 μm) von Agilent Technologies (Signaldetektion bei 210 nm) bzw. einem Thermo Finnigan LCQ Advance Max ESI-MS-Spektrometer oder an einem LCQFL-10402 mit einer LCQ Fleet Ionenfalle der Firma Thermo Scientific aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden jeweils Acetonitril (mit 0.1 % Ameisensäure oder 0.1 % Ammoniumacetat) und H₂O (mit 0.1 % Ameisensäure oder 0.1 % Ammoniumacetat) verwendet. Die GC-MS Spektren wurden an einem 6890N Network GC System mit einem 5973

Network Mass Selektive Detektor der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Die Proben wurden hierzu in EA gelöst.

Die optischen Drehwerte wurden an einem Polatronik HH8 Polarimeter der Firma Schmidt + Haensch aufgenommen. Die verwendeten Konzentrationen und Lösungsmittel sind an jeweiliger Stelle angegeben.

5.2 Synthese des Naturstoffes Callysponginsäure (1)

5.2.1 Generelle Methoden

5.2.1.1 Generelle Methode A: Kupplungsreaktion mit *n*-BuLi

Zu einer Lösung des Eduktes mit der endständigen Dreifachbindung (2 eq.) in THF und HMPA wurde bei -15°C *n*-BuLi (4.5 eq.) zugetropft. Nach 20 min wurde das halogenierte Edukt (1 eq.) als Lösung in THF zugetropft und bei 0°C gerührt. Die entstandene Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt, wobei sich die Lösung auf RT erwärmen konnte, und die Reaktion durch Zugabe von ges. NaHCO₃-Lösung gestoppt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EA extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde zur Trockene eingedampft und das Rohprodukt durch säulenchromatographische Reinigung aufgereinigt.

5.2.1.2 Generelle Methode B: Bromierung mit NBS

Zu einer Lösung des Alkohols (1 eq.) und PPh₃ (1.3 eq.) in DMF wurde bei 0 °C in DMF gelöstes NBS (1.3 eq.) langsam zugegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 2 h gerührt. Anschließend wurde MeOH zugegeben, kurz gerührt EA zugegeben. Die organische Phase wurde dreimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und die organische Phase zur Trockene eingedampft. Das Rohprodukt wurde dann über eine Kieselgelsäule aufgereinigt.

5.2.1.3 Generelle Methode C: Tosylierung eines Alkohols

Zu einer Lösung des Alkohols (1 eq.) in Pyridin wurde bei 0°C Tos-Cl (1.2 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei 0°C gerührt. Anschließend wurde auf RT erwärmt, EA zugegeben. Die organische Phase wurde jeweils einmal

mit 1N HCl-Lösung, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingedampft. Das Rohprodukt wurde anschließend über eine Kieselgelsäule aufgereinigt.

5.2.1.4 Generelle Methode D: Jonesoxidation

Eine Chrom-Säure-Stamm-Lösung wurde aus CrO₃ (2.2 eq., 2.74 Min H₂O) und einer wässrigen H₂SO₄-Lösung (23 %, in H₂O) hergestellt und auf 0°C gekühlt. Eine Lösung des Alkohols (1 eq.) wurde in Aceton auf 0°C gekühlt und die Cr-Säure-Stamm-Lösung langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 1h gerührt, bevor Wasser zugegeben wurde. Die dabei entstehenden Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit DEE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhalten.

5.2.1.5 Generelle Methode E: Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan

Zu einer Lösung des Alkohols (1 eq.) in DCM wurde DMP (1 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung für 1h gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC kontrolliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. K₂CO₃-Lösung (20 mL) gestoppt. Anschließend wurde dreimal mit EA extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingedampft. Das Rohprodukt wurde anschließend über eine Kieselgelsäule aufgereinigt.

5.2.1.6 Generelle Methode F: Wittigreaktion

Eine Lösung des Aldehyds (1 eq.) und Methyl-2-(triphenylphosphoranylidene)acetat (**36**, 1.2 eq.) in DCM wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden.

5.2.1.7 Generelle Methode G: Reduktion mit DIBAL-H

Zu einer Lösung des Methylesters (1 eq.) in Toluol wurde bei -78°C eine 1 M DIBAL-H in Toluol (2.5 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung für 1h gerührt.

Anschließend wurde 150 mL EA zugegeben und die Reaktionsmischung auf 0°C erwärmt. Dann wurde ges. K-Na-Tartrat-Lösung zugegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 45 min auf 40°C erhitzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase einmal mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, zur Trockene eingedampft und der Rückstand über eine Kieselgelsäule aufgereinigt.

5.2.1.8 Generelle Methode H: Reduktion mit MnO₂

Zu einer Lösung des Alkohols (1 eq.) in DCM wurde im Ofen voraktiviertes MnO₂ (20 eq.) in kleinen Portionen als Feststoff gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Überschüssiges MnO₂ wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde dann mittels einer Kieselgelsäule aufgereinigt.

5.2.1.9 Generelle Methode I: Alkynilierungsreaktion

Zu einer 2 M Lösung von Dimethylzink in Toluol (2.95 eq.) wurde in Toluol gelöstes Trimethylsilylacetylen (**37**, 2.8 eq.) gegeben, die entstandene Reaktionsmischung wurde kurz gerührt und anschließend 90 min ohne Rühren bei RT stehen gelassen. In einen frischen Kolben wurde der Ligand (*R,R*)-(-)-2,6-Bis[2-(hydroxydiphenylmethyl)1-pyrrolidiny]methyl]-4-methylphenol vorgelegt und die Zinklösung langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde solange gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet werden konnte (ca. 10 min). Anschließend wurde eine Lösung des Aldehyds (1 eq.) in Toluol bei 0°C langsam zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde versiegelt und bei 4°C für 4 Tage in den Kühlschrank gestellt, was zum Ausfällen eines weißen Feststoffes führte. Die Reaktionsmischung wurde dann mit ges. NH₄Cl-Lösung gestoppt, wodurch eine erneute Gasentwicklung auftrat. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit EA extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde dann säulenchromatographisch aufgereinigt.

5.2.1.10 Generelle Methode J: C-H-Bromierung der Dreifachbindung

Zu einer Lösung des Eduktes mit der endständigen Dreifachbindung (1 eq.) in Aceton wurde bei 0°C NBS (1.2 eq.) und AgNO₃ (0.1 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung 30 min gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaHCO₃-Lösung gestoppt und dreimal mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, zur Trockene eingedampft und der Rückstand über eine Kieselgelsäule aufgereinigt.

5.2.1.11 Generelle Methode K: C-H-Iodierung der Dreifachbindung

Zu einer Lösung des Eduktes mit endständiger Dreifachbindung (1 eq.) in MeOH wurde bei 0°C in Wasser gelöstes KOH (2.5 eq.) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 10 min gerührt. Anschließend wurde I₂ (1.1 eq.) zugegeben, die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und für 3h gerührt. Zur Reaktionsmischung wurde weiteres Wasser gegeben und dreimal mit DEE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen, die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde dann durch säulenchromatographische Reinigung aufgereinigt.

5.2.1.12 Generelle Methode L: Cadiot-Chodkiewicz-Reaktion unter Verwendung von Pyrrolidin

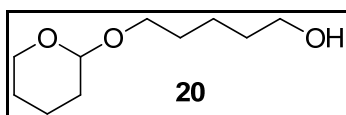
Zu einer Lösung des halogenierten Eduktes (1 eq.) und des Eduktes mit der endständigen Dreifachbindung (2 eq.) in Pyrrolidin wurde CuI (0.1 eq.) und PdCl₂(PPh₃)₂ (0.05 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 1.5 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NH₄Cl-Lösung gestoppt und die Reaktionsmischung dreimal mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, dann über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde dann durch eine Kieselgelchromatographiesäule aufgereinigt.

5.2.1.13 Generelle Methode M: Cadiot-Chodkiewicz-Reaktion

Zu einer Lösung des Eduktes mit der endständigen Dreifachbindung (1.2 eq.) und des halogenierten Eduktes (1 eq.) in THF wurde CuI (0.03 eq.), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.03 eq.) und DIEA (1.8 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung 12h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2N HCl gequencht, zweimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde anschließend durch eine Kieselgel-chromatographiesäule aufgereingt.

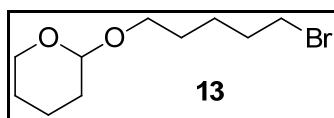
5.2.2 Synthese des 1. Bausteins

5.2.2.1 Synthese von 5-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)pentan-1-ol (**20**)



Zu einer Lösung aus 1,5-Pentandiol (**9**, 1g, 9.6 mmol) in DCM (20 mL) wurde DHP (877.8 µL, 9.6 mmol, 1 eq.) und PPTS (1.2 g, 4.8 mmol, 0.5 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂O (60 mL) gestoppt und die Reaktionsmischung dreimal mit EA extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand über eine Kieselgel-chromatographiesäule gereinigt (CH/EA 2:1, R_f = 0.3). Das Produkt **20** (1.04 g, 5.5 mmol) konnte in 58% Ausbeute erhalten werden. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 4.58 – 4.56 (m, 1H), 3.89 – 3.83 (m, 1H), 3.78 – 3.72 (m, 1H), 3.67 – 3.63 (m, 2H), 3.52 – 3.47 (m, 1H), 3.43 – 3.37 (m, 1H), 1.85 – 1.79 (m, 1H), 1.74 – 1.67 (m, 1H), 1.65 – 1.47 (m, 10H).

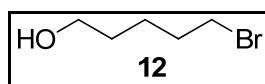
5.2.2.2 Synthese von 2-((5-Brompentyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran (**13**)



Zu einer Lösung aus **20** (413.5 mg, 2.2 mmol) und PPh₃ (760.7 mg, 2.9 mmol, 1.3 eq.) in DMF (3.3 mL) wurde bei 0°C eine Lösung aus NBS (509.0 mg, 2.9 mmol, 1.3 eq.) in DMF (1.9 mL) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt, währenddessen sich die Mischung auf RT erwärmen konnte. Anschließend

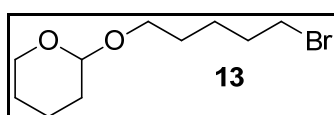
wurde MeOH (0.28 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 5 min gerührt. EA wurde bis zum Auftreten einer Phasenbildung zugegeben und die organische Phase zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde diese zur Trockene eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch (cH/EA 9:1, R_f = 0.27) aufgereinigt, so dass Produkt **13** (386.4 mg, 1.5 mmol, 70%) rein erhalten werden konnte. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 4.56 – 4.54 (m, 1H), 3.87 – 3.81 (m, 1H), 3.75 – 3.70 (m, 1H), 3.51 – 3.45 (m, 1H), 3.41 – 3.36 (m, 3H), 1.91 – 1.84 (m, 2H), 1.82 – 1.76 (m, 1H), 1.72 – 1.66 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 2H), 1.54 – 1.46 (m, 6H); GC-MS: t_R 40.99 min, m/z 249 (21%) [M]⁺, 149 (100%) [M-OTHP]⁺, 101 (21%) [M-OTHP]⁺, 250.06 berechnet für C₁₀H₁₉BrO₂.

5.2.2.3 Synthese von 5-Brompentan-1-ol (**12**)



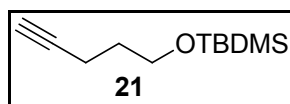
Zu einer Lösung aus 1,5-Pentandiol (**9**, 500 mg, 4.8 mmol) in Toluol (15 mL) wurde eine 48%ige aq. HBr-Lösung (0.65 mL, 5.8 mmol, 1.2 eq.) gegeben und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde einmal mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit 1M NaOH, ges. NaCl-Lösung und 1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde zur Trockene eingedampft und das Rohprodukt säulenchromatographisch mittels Gradient (cH/EA 2:1, R_f = 0.06 in cH/EA 5:1) aufgereinigt. Das Produkt **12** (678.9 mg, 4.1 mmol, 85%) konnte als gelbliche Flüssigkeit isoliert werden. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 3.64 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.92 – 1.85 (m, 2H), 1.62 – 1.47 (m, 4H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 62.52, 33.65, 32.46, 31.72, 24.39; GC-MS: t_R 32.48 min, m/z 167 (5%) [M]⁺, 148 (100%) [M-OH]⁺, 166 berechnet für C₅H₁₁BrO.

5.2.2.4 Synthese von 2-((5-Bromopentyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran (**13**)



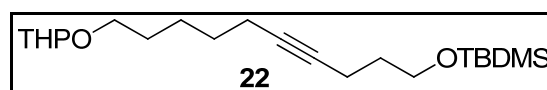
12 (4.0 g, 23.9 mmol) wurde in DCM (10 mL) gelöst und mit 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (2.7 mL, 29.7 mmol, 1.24 eq.) und 35 Tropfen konzentrierter HCl versetzt. Nach 4 h wurde cH zugegeben und die organische Phase mit ges. NaHCO₃ gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde zur Trockene eingedampft und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, R_f = 0.32) gereinigt. **13** (5.6 mg, 22.3 mmol, 93%) wurde als klare Flüssigkeit erhalten. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 4.56 – 4.54 (m, 1H), 3.87 – 3.81 (m, 1H), 3.75 – 3.70 (m, 1H), 3.51 – 3.45 (m, 1H), 3.41 – 3.36 (m, 3H), 1.91 – 1.84 (m, 2H), 1.82 – 1.76 (m, 1H), 1.72 – 1.66 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 2H), 1.54 – 1.46 (m, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ / ppm: 98.81, 67.13, 62.27, 33.63, 32.55, 30.68, 28.81, 25.41, 24.29, 19.59; GC-MS: t_R 40.99 min, m/z 249 (21%) [M]⁺, 149 (100%) [M-OTHP]⁺, 101 (21%) [M-OTHP]⁺, 250.06 berechnet für C₁₀H₁₉BrO₂.

5.2.2.5 Synthese von *tert*-Butyldimethyl(pent-4-in-1-yloxy)silan (**21**)



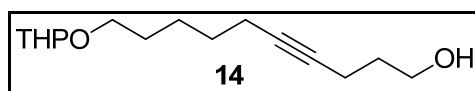
Eine Lösung aus 4-Pentin-1-ol (**17**, 555.6 µL, 5.9 mmol) und Imidazol (1.0 g, 14.8 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) wurde auf 0°C gekühlt. Eine Lösung aus TBDMS-Cl (1.2 g, 6.5 mmol, 1.1 eq.) in DCM (5 mL) wurde innerhalb von 10 min zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und konnte sich dabei auf RT erwärmen. Wasser (30 mL) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung dreimal mit EA extrahiert und die vereinigten organischen Phase einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, zur Trockene eingeeengt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (cH/EA 19:1, R_f = 0.89) gereinigt. Das Produkt **21** (928.1 mg, 4.7 mmol) konnte in 80% Ausbeute als klare Flüssigkeit erhalten werden. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 3.70 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 2.27 (td, 2H, J = 7.1, 2.7 Hz), 1.92 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 1.73 (dq, 2H, J = 7.1, 6.1 Hz), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

5.2.2.6 Synthese von *tert*-Butyldimethyl((10-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)dec-4-in-1-yl)oxy)silan (**22**)



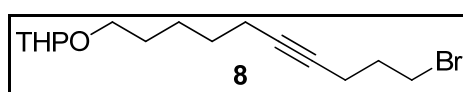
Zu einer Lösung aus **21** (581.8 mg, 2.9 mmol, 1 eq.) in THF (6 mL) wurde bei -70°C *n*-BuLi (4.0 mL, 6.38 mmol, 1.6 M in Hexan, 2.2 eq.) langsam zugegeben und die Reaktionsmischung 30 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf -50°C erwärmt und HMPA (1.5 mL) und **13** (810.2 mg, 3.2 mmol, 1.1 eq.) in THF (3 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei -50°C gerührt und anschließend durch Zugabe mit 2N HCl gestoppt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene eingengt und der Rückstand anschließend über eine Kieselgelsäule (cH/EA 19:1, $R_f = 0.36$) gereinigt. Das Produkt **22** (419.2 mg, 1.1 mmol) konnte in 34% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.58 - 4.57 (m, 1H), 3.90 - 3.84 (m, 1H), 3.76 - 3.68 (m, 2H), 3.53 - 3.47 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 2.27 (td, $J = 7.1, 2.7$ Hz, 4H), 1.88 - 1.79 (m, 1H), 1.76 - 1.67 (m, 2H), 1.63 - 1.48 (m, 4H), 1.38 - 1.23 (m, 7H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

5.2.2.7 Synthese von 10-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)dec-4-in-1-ol (**14**)



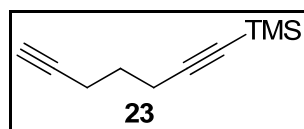
Es wurde nach der generellen Methode A vorgegangen. Die Ansatzgröße betrug 45.8 mmol. Nach säulenchromatographischer Reinigung (cH/ EA 2:1, $R_f = 0.36$) konnte das Produkt **14** (5.5 g, 21.5 mmol, 94%) als gelbliche Flüssigkeit isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.59 - 4.54 (m, 1H), 3.87 - 3.79 (m, 1H), 3.74 - 3.70 (m, 3H), 3.63 - 3.60 (m, 1H), 3.51 - 3.43 (m, 1H), 2.31 - 2.22 (m, 2H), 2.16 - 2.11 (m, 2H), 1.81 - 1.69 (m, 4H), 1.60 - 1.40 (m, 10H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 98.75, 80.73, 79.58, 62.66, 61.86, 61.39, 32.15, 30.60, 29.20, 28.63, 25.43, 24.89, 19.43, 18.62, 15.36; GC-MS: t_R 50.81 min, m/z 85 (100%) [M-THP] $^+$, 169 (4%) [M-THP] $^+$, 101 (12%) [M-OTHP] $^+$, 153 (1%) [M-OTHP] $^+$, 169.12 berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}$.

5.2.2.8 Synthese von 2-((10-Bromdec-6-in-1-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran (**8**)



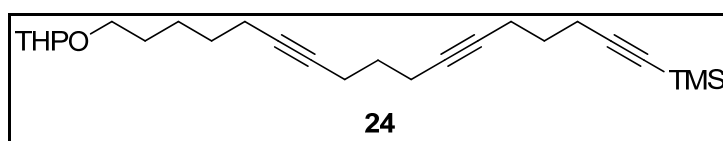
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode B mit einer Ansatzgröße von 10.1 mmol durchgeführt. Nach der Kieselgelchromatographie (cH/EA 9:1, $R_f = 0.4$) konnte das Produkt **8** (2.9 g, 9.1 mmol, 91%) isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ /ppm: 4.57 – 4.55 (m, 1H), 3.88 – 3.83 (m, 1H), 3.73 (dt, $J = 9.6, 6.7$ Hz, 1H), 3.50 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H), 3.38 (dt, $J = 9.6, 6.6$ Hz, 1H), 2.34 – 2.30 (m, 2H), 2.21 – 2.16 (m, 2H), 1.86 – 1.77 (m, 1H), 1.73 – 1.67 (m, 1H), 1.63 – 1.53 (m, 4H), 1.54 – 1.41 (m, 8H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ /ppm: 98.81, 81.26, 77.96, 67.40, 62.29, 32.52, 31.85, 30.73, 29.23, 28.81, 25.48, 25.46, 19.64, 18.62, 17.45; ESI-MS: t_R 52.56 min, m/z 85 (100%) $[\text{M THP}]^+$, 101 (10%) $[\text{M OTHP}]^+$, 215 (1%) $[\text{M-OTHP}]^+$, 231 (1%) $[\text{M-THP}]^+$, 215.04 berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{Br}$.

5.2.2.9 Synthese von Hepta-1,6-diin-1-yltrimethylsilan (**23**)



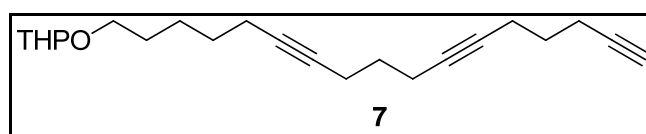
Eine Lösung aus 1,6-Heptadiin (**18**, 617.3 μL , 5.4 mmol) in THF (27 mL) wurde auf -78°C gekühlt. LHMDs (6.5 mL, 6.5 mmol, 1M in Hexan, 1.2 eq.) wurde langsam zugegeben und die Reaktionsmischung für 1h gerührt. Dann wurde TMS-Cl (826.2 μL , 6.5 mmol, 1.2 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 2h gerührt. Anschließend wurde ges. NH_4Cl -Lösung zugegeben und die Reaktionsmischung auf RT auftauen lassen. Diese wurde dann zweimal mit EA extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockene eingedampft. Das Produkt **23** (729.2 mg, 4.4 mmol, 81%) konnte dann nach Kieselgelsäule (cH/EA 19:1, $R_f = 0.86$) des Rückstandes als gelbliches Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ /ppm: 2.37 – 2.28 (m, 4H), 1.96 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.78 – 1.70 (m, 2H), 0.14 (s, 9H).

5.2.2.10 Synthese von Trimethyl(17-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)heptadeca-1,6,11-triin-1-yl)silan (**24**)

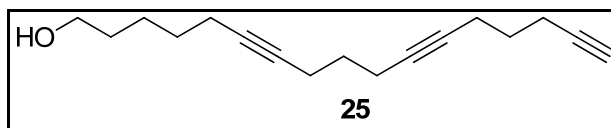


Es wurde nach der generellen Methode A mit einer Ansatzgröße von 1.4 mmol gearbeitet. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 und Eindampfung zur Trockene wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (cH/EA 19:1, $R_f = 0.2$) gereinigt. Das Produkt **24** (85.2 mg, 0.21 mmol) wurde in 30% Ausbeute erhalten. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.58 - 4.57 (m, 1H), 3.90 - 3.84 (m, 1H), 3.77 - 3.71 (m, 1H), 3.53 - 3.47 (m, 1H), 3.42 - 3.36 (m, 1H), 2.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.28 - 2.21 (m, 6H), 2.18 - 2.13 (m, 2H), 1.85 - 1.78 (m, 2H), 1.75 - 1.56 (m, 12H), 1.55 - 1.42 (m, 2H), 0.14 (s, 9H).

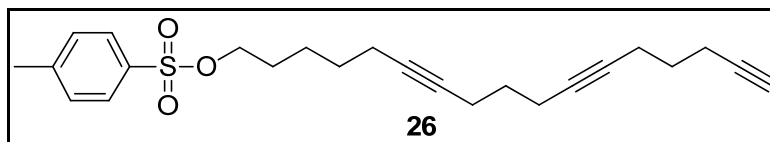
5.2.2.11 Synthese von 2-(Heptadeca-6,11,16-triin-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran (**7**)



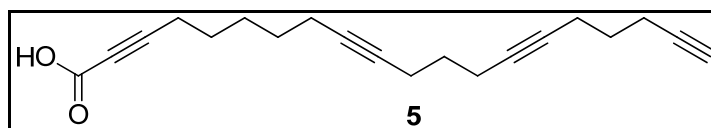
Zu einer Lösung aus *n*-BuLi (1.0 mL einer 1.6 M Lösung in Hexan, 1.6 mmol, 2.6 eq) in THF (2.5 mL) wurde bei -78°C 1,6-Heptadiin (**17**, 68.3 μL , 0.6 mmol, 1 eq.) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung für 1h gerührt. HMPA (210.8 μL , 1.2 mmol, 2 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 30 min gerührt. Dann wurde eine Lösung aus **8** (187.4 mg, 0.6 mmol) in THF (0.5 mL) zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt, wobei diese sich auf RT erwärmen konnte. Anschließend wurde Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung dreimal mit EA extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das nach Abdampfen erhaltene Rohprodukt über eine Kieselgelsäule gereinigt (cH/EA 9:1, $R_f = 0.1$). Das Produkt **7** konnte als gelbliche Flüssigkeit (139.7 mg, 0.43 mmol, 71 %) erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.55 - 4.53 (m, 1H), 3.86 - 3.81 (m, 1H), 3.70 (dt, $J = 9.6, 6.8$ Hz, 1H), 3.49 - 3.44 (m, 1H), 3.36 (dt, $J = 9.6, 6.6$ Hz, 1H), 2.28 - 2.26 (m, 1H), 2.25 - 2.23 (m, 2H), 2.22 - 2.19 (m, 5H), 2.14 - 2.10 (m, 2H), 1.92 (td, $J = 2.6, 0.7$ Hz, 1H), 1.83 - 1.75 (m, 1H), 1.68 - 1.60 (m, 5H), 1.57 - 1.54 (m, 3H), 1.53 - 1.39 (m, 8H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 99.06, 83.98, 80.84, 80.33, 79.58, 79.51, 68.84, 67.69, 62.54, 31.00, 29.52, 29.17, 28.84, 28.18, 25.75, 25.74, 19.90, 18.94, 18.18, 18.14, 18.07, 17.74; GC-MS: t_R 59.04 min, m/z 328 (1%) $[\text{M}]^+$, 261 (1%) $[\text{M C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_2]$, 244 (3%) $[\text{M-THP}]^+$, 171 (18%) $[\text{M C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_2]$, 157 (16%) $[\text{M C}_{12}\text{H}_{13}]$, 85 (100%) $[\text{M THP}]^+$, 67 (18%) $[\text{M C}_5\text{H}_7]$, 328.24 berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$.

5.2.2.12 Synthese von Heptadeca-6,11,16-triin-1-ol (**25**)

Zu einer Lösung aus **7** (2.6 g, 7.9 mmol) in MeOH (20 mL) wurde PPTS (992.6 mg, 3.95 mmol, 0.5 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Diese wurde anschließend mit EA verdünnt und die organische Phase jeweils einmal mit ges. NH_4Cl -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch (cH/EA 2:1, $R_f = 0.41$) gereinigt. Das Produkt **25** (1.86 g, 7.6 mmol, 97%) konnte als gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ /ppm: 3.65 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.33 – 2.22 (m, 8H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.95 (t, $J = 2.7$ Hz, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 3H), 1.59 – 1.45 (m, 7H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 83.98, 80.72, 80.31, 79.62, 79.61, 68.85, 63.07, 32.48, 29.03, 28.78, 28.15, 25.19, 18.92, 18.14, 18.10, 18.05, 17.72.

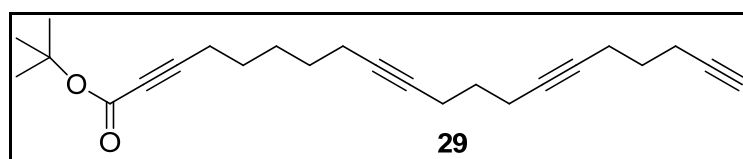
5.2.2.13 Synthese von Heptadeca-6,11,16-triin-1-yl-4-methylbenzenesulfonat (**26**)

Die Reaktion wurde nach der generellen Methode C mit einer Ansatzgröße von 4.09 mmol durchgeführt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene eingengt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, $R_f = 0.30$) aufgereinigt. Das Produkt **26** (1.29 g, 3.2 mmol, 79%) konnte als leicht orange Flüssigkeit erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ /ppm: 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.34 (dd, $J = 8.6, 0.6$ Hz, 2H), 4.03 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.30 – 2.20 (m, 8H), 2.14 – 2.07 (m, 2H), 1.95 (td, $J = 2.6, 0.8$ Hz, 1H), 1.72 – 1.61 (m, 6H), 1.46 – 1.35 (m, 4H).

5.2.2.14 Synthese von Icosa-2,9,14,19-tetrainsäure (**5**)

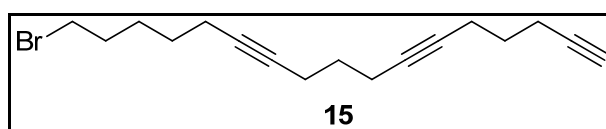
Zu einer Lösung aus Propinsäure (**27**, 11.06 μL , 0.18 mmol, 2 eq.) in THF (1 mL) wurde bei 0°C *n*-BuLi (225.0 μL , 0.36 mmol, 1.6 M in Hexan, 4 eq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und für 1h gerührt. **26** (36.9 mg, 0.09 mmol) wurde in HMPA (135 μL) gelöst, zugetropft und die entstandene Reaktionsmischung für 24 h bei RT gerührt. 5%ige NaOH-Lösung und DEE wurden. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase einmal mit DEE extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 1N HCl angesäuert und erneut zweimal mit DEE extrahiert. Die letzteren organischen Phasen wurden dann jeweils einmal mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockene eingengt. Das Produkt **5** (14.8 mg, 0.05 mmol, 55%) konnte ohne Reinigung als bräunlich-gelbes Öl erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 2.29 – 2.19 (m, 10H), 2.18 – 2.12 (m, 2H), 1.68 – 1.57 (m, 5H), 1.56 – 1.45 (m, 5H).

5.2.2.15 Synthese von *tert*-Butyl-icosa-2,9,14,19-tetrainoat (**29**)



Die Reaktion wurde nach der generellen Methode A mit einer Ansatzgröße von 0.5 mmol durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2N HCl gestoppt und zweimal mit DCM extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 19:1, R_f = 0.3) gereinigt. Das Produkt **29** (8.3 mg, 0.02 mmol, 12%) konnte als gelbes Öl erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 2.34 – 2.20 (m, 8H), 2.15 – 2.12 (m, 2H), 1.96 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 1.76 – 1.58 (m, 10H), 1.57 – 1.42 (m, 9H).

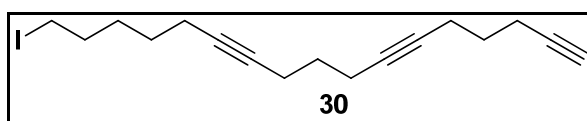
5.2.2.16 Synthese von 17-Bromheptadeca-1,6,11-triin (**15**)



Es wurde nach der generellen Methode B mit einer Ansatzgröße von 0.52 mmol gearbeitet. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 und Einengung zur

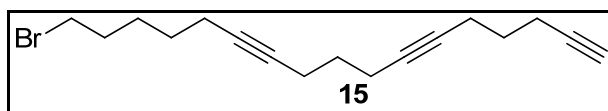
Trockene im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (cH/EA 19:1, $R_f = 0.7$) gereinigt. Das Produkt **15** (20.0 mg, 0.07 mmol, 13%) konnte als gelbes Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.41 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.31 – 2.23 (m, 8H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.95 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.90 – 1.84 (m, 2H), 1.67 (dp, $J = 24.5, 7.0$ Hz, 4H), 1.56 – 1.47 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 83.90, 80.37, 80.22, 79.78, 79.56, 68.78, 33.78, 32.49, 28.72, 28.32, 28.11, 27.53, 18.75, 18.07, 18.00, 17.67; GC-MS: t_R 52.94 min, m/z 306 (4%) $[\text{M}]^+$, 227 (2%) $[\text{M-Br}]^+$, 77 (100%) $[\text{M Br}]^+$, 306.10 berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{Br}$.

5.2.2.17 Synthese von 17-Iodoheptadeca-1,6,11-triin (**30**)



Zu einer Lösung aus **26** (200 mg, 0.5 mmol) in DCM (0.8 mL) wurde LiI (133.8 mg, 1.0 mmol, 2 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung für 2h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Wasserzugabe gestoppt und anschließend dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Das Produkt **30** (155.6 mg, 0.44 mmol, 88%) konnte nach einer Kieselgel-chromatographiesäule (cH/EA 50:1, $R_f = 0.37$) des Rückstandes als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.31 – 2.21 (m, 8H), 2.16 – 2.14 (m, 2H), 1.95 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.87 – 1.80 (m, 2H), 1.67 (dp, $J = 21.1, 7.0$ Hz, 4H), 1.51–1.48 (m, 4H).

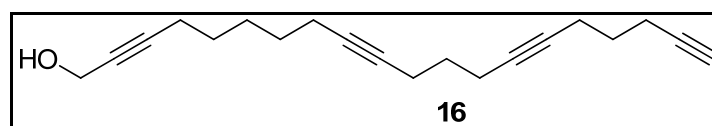
5.2.2.18 Synthese von 17-Bromheptadeca-1,6,11-triin (**15**)



Br_2 (0.5 mL) und DCM (9.5 mL) wurden gemischt, von dieser Lösung ein Aliquot (360 μL) entnommen und durch Zugabe von DCM (1.5 mL) verdünnt. PPh_3 (86.6 mg, 0.33 mmol, 1.1 eq.) wurde in DCM (2 mL) gelöst und zu dieser Bromlösung zugegeben. Eine Lösung aus **7** (100.0 mg, 0.3 mmol) in DCM (0.5 mL) wurde zugetropft und die Reaktionsmischung für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von DCM verdünnt und zweimal mit Wasser gewaschen. Die wässrige

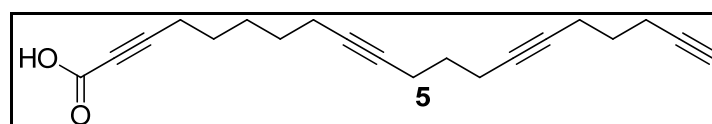
Phase wurde mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das durch Eindampfen der organischen Phasen erhaltene Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (cH/EA 50:1, $R_f = 0.44$) gereinigt und das Produkt **15** (84.7 mg, 0.28 mmol) in 92% Ausbeute erhalten. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.41 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.31 – 2.23 (m, 8H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.95 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.90 – 1.84 (m, 2H), 1.67 (dp, $J = 24.5, 7.0$ Hz, 4H), 1.56 – 1.47 (m, 4H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 83.90, 80.37, 80.22, 79.78, 79.56, 68.78, 33.78, 32.49, 28.72, 28.32, 28.11, 27.53, 18.75, 18.07, 18.00, 17.67; GC-MS: t_R 52.94 min, m/z 306 (4%) $[\text{M}]^+$, 227 (2%) $[\text{M}-\text{Br}]^+$, 77 (100%) $[\text{M Br}]^+$, 306.10 berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{Br}$.

5.2.2.19 Synthese von Icosa-2,9,14,19-tetrain-1-ol (**16**)



Es wurde nach der generellen Methode A mit einer Ansatzgröße von 1.5 mmol gearbeitet. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das durch Eindampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 5:1) aufgereinigt und das Produkt **16** (205.0 mg, 0.73 mmol) in 48% Ausbeute erhalten. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.25 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H), 2.32 – 2.21 (m, 10H), 2.18 – 2.13 (m, 2H), 1.96 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.68 (dp, $J = 20.8, 6.9$ Hz, 4H), 1.51 – 1.47 (m, 4H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 86.55, 83.93, 80.69, 80.27, 79.56, 78.58, 68.79, 51.57, 28.80, 28.78, 28.71, 28.26, 28.19, 28.08, 18.81, 18.78, 18.09, 18.05, 17.99, 17.66; GC-MS: t_R 9.79 min, m/z 541.39 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 542.32 berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_3\text{Si}$.

5.2.2.20 Synthese von Icosa-2,9,14,19-tetrainsäure (**5**)

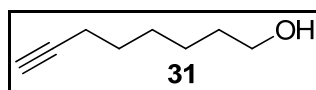


Die Reaktion wurde mit einer Ansatzgröße von 0.12 mmol nach der generellen Methode D durchgeführt. Das Produkt **5** (32.7 mg, 0.11 mmol) konnte in 91% erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 2.32 – 2.22 (m, 10H), 2.17 –

2.13 (m, 2H), 1.95 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.73 – 1.59 (m, 6H), 1.52 – 1.45 (m, 4H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 157.61, 92.35, 83.93, 80.39, 80.24, 79.78, 79.56, 72.83, 68.79, 28.80, 28.69, 28.52, 28.08, 27.10, 18.85, 18.69, 18.09, 18.05, 17.98, 17.65; LC-MS(ESI): t_R 8.46 min, m/z 469.23 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 470.28 berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_3$.

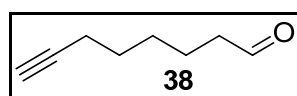
5.2.3 Synthese des 2. Bausteins

5.2.3.1 Synthese von 7-Octin-1-ol (**31**)



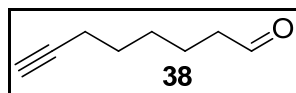
Ethylendiamin (100 mL) wurde entgast und auf 0°C gekühlt. NaH (3.8 g, 15.8 mmol, 4 eq.) wurde als Feststoff zugegeben und die Reaktionsmischung auf RT erwärmt. Nach Rühren der Mischung für 1h wurde auf 60°C erwärmt und diese eine weitere Stunde gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 45°C abgekühlt und 3-Octin-1-ol (**11**, 5.7 mL, 39.6 mmol) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 65°C erwärmt, für 1h gerührt und anschließend langsam auf 0°C abgekühlt. Wasser (70 mL) und 1N HCl-Lösung (70 mL) wurden langsam zugegeben, mit weiterer 1N HCl (140 mL) verdünnt und zweimal mit EA extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1N HCl (70 mL) verdünnt und weitere zweimal mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene eingedampft und der Rückstand über eine Kieselgelsäule gereinigt (cH/EA 2:1, $R_f = 0.36$). Das Produkt **31** (4.82 g, 38.2 mmol) konnte in 96% Ausbeute erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.62 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.17 (dt, $J = 2.7$ Hz, 6.9 Hz, 2H), 1.92 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.60 – 1.49 (m, 4H), 1.46 – 1.34 (m, 4H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 84.5, 68.2, 62.8, 32.5, 28.4, 28.3, 25.2, 18.3; GC-MS: t_R 27.22 min, m/z 125 (100%) $[\text{M}]^+$, 126.10 berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$.

5.2.3.2 Synthese von Oct-7-inal (**38**)



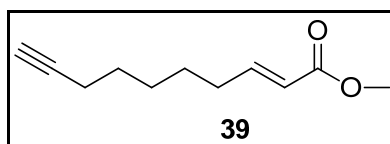
Zu einer Lösung aus DMSO (195.3 μL , 2.75 mmol, 1.1 eq.) in DCM (4.5 mL) wurde bei -78°C Oxalylchlorid (235.8 μL , 2.75 mmol, 1.1 eq.) zugetropft und die Reaktionsmischung für 2h gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus **31** (315.5 mg, 2.5 mmol) in DCM (9 mL) zugetropft und die Mischung eine weitere Stunde gerührt. Dann wurde NEt_3 (554.4 μL , 4.0 mmol, 1.6 eq.) zugetropft und die Reaktionsmischung auf RT erwärmt. Diese wurde über Nacht gerührt und anschließend durch Zugabe von 1N HCl gestoppt, bis eine klare Phasentrennung zu erkennen war. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils einmal mit ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 5:1, $R_f = 0.45$) gereinigt. Das Produkt **38** (174.3 mg, 1.4 mmol, 56%) konnte als gelbliches Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 9.77 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 2.44 (td, $J = 7.3, 1.7$ Hz, 2H), 2.20 (dt, $J = 7.1, 3.5$ Hz, 2H), 1.94 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.69 – 1.62 (m, 2H), 1.58 – 1.52 (m, 2H), 1.49 – 1.42 (m, 2H).

5.2.3.3 Synthese von Oct-7-inal (**38**)



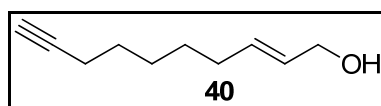
Es wurde nach der generellen Methode E gearbeitet und eine Ansatzgröße von 1.6 mmol gewählt. Das Produkt **38** (178.7 mg, 1.4 mmol, 90%) konnte nach Kieselgelsäule (cH/EA 7:1, $R_f = 0.46$) als gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 9.77 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 2.44 (td, $J = 7.3, 1.7$ Hz, 2H), 2.20 (dt, $J = 7.1, 3.5$ Hz, 2H), 1.94 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.69 – 1.62 (m, 2H), 1.58 – 1.52 (m, 2H), 1.49 – 1.42 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 202.53, 84.28, 68.53, 43.82, 28.28, 28.24, 21.65, 18.31.

5.2.3.4 Synthese von Methyl-dec-2-en-9-inoat (**39**)



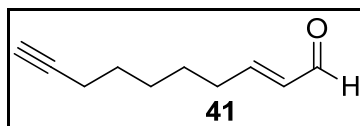
Die Reaktion wurde in einer Ansatzgröße von 12.9 mmol nach der generellen Methode F durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (cH/EA 9:1, R_f = 0.60) gereinigt. Das Produkt **39** (1.9 g, 10.4 mmol) konnte in 81% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 6.99 – 6.89 (m, 1H), 5.80 (dtd, J = 15.6, 1.6, 0.7 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.24 – 2.12 (m, 4H), 1.92 (td, J = 2.7, 0.6 Hz, 1H), 1.53 – 1.39 (m, 6H).

5.2.3.5 Synthese von Dec-2-en-9-in-1-ol (**40**)

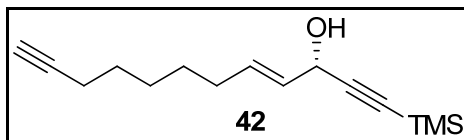


Es wurde nach der generellen Methode G mit einer Ansatzgröße von 5.3 mmol gearbeitet. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde diese im Vakuum eingedampft und der Rückstand über eine Kieselgel-chromatographiesäule (cH/EA 2:1, R_f = 0.44) aufgereinigt. Das Produkt **40** (743.9 mg, 4.9 mmol) konnte in 92% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.74 – 5.59 (m, 2H), 4.11 – 4.05 (m, 2H), 2.18 (td, J = 7.0, 2.7 Hz, 2H), 2.08 – 2.03 (m, 2H), 1.94 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 1.59 – 1.49 (m, 2H), 1.48 – 1.33 (m, 4H).

5.2.3.6 Synthese von Dec-2-en-9-in-1-al (**41**)

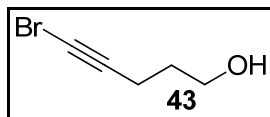


Die Reaktion wurde nach der generellen Methode H mit einer Ansatzgröße von 0.712 mmol durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 5:1, R_f = 0.54) gereinigt. Das Produkt **41** (88.4 mg, 0.59 mmol, 83%) konnte als gelbliche Flüssigkeit isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 9.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.84 (dt, J = 15.6, 6.8 Hz, 1H), 6.12 (ddt, J = 15.6, 7.9, 1.5 Hz, 1H), 2.39 – 2.31 (m, 2H), 2.20 (td, J = 6.9, 2.6 Hz, 2H), 1.94 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 1.58 – 1.45 (m, 6H).

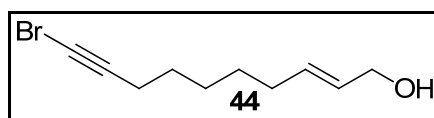
5.2.3.7 Synthese von (S)-1-(Trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-ol (**42**)

Es wurde nach der generellen Methode I in einer Ansatzgröße von 0.59 mmol gearbeitet. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, R_f = 0.26) gereinigt und das Produkt **42** (29.8 mg, 0.12 mmol) konnte in 20% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.92 – 5.83 (m, 1H), 5.59 (ddt, J = 15.3, 6.1, 1.5 Hz, 1H), 4.83 – 4.80 (m, 1H), 2.19 (td, J = 7.0, 2.7 Hz, 2H), 2.11 - 2.06 (m, 2H), 1.94 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 1.58 – 1.50 (m, 2H), 1.47 – 1.39 (m, 4H), 0.18 (s, 9H).

Die Reaktion wurde ebenfalls mit dem anderen Liganden zur Einführung des anderen Stereozentrums durchgeführt. Die Ansatzgröße betrug 0.7 mmol und die Reaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Das Produkt (63.3 mg, 0.25 mmol) konnte mit 36% Ausbeute isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.92 – 5.82 (m, 1H), 5.59 (ddt, J = 15.2, 6.1, 1.5 Hz, 1H), 4.82 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 2.21 - 2.16 (m, 2H), 2.09 – 2.05 (m, 2H), 1.94 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 1.57 – 1.50 (m, 2H), 1.43 – 1.41 (m, 4H), 0.18 (s, 9H).

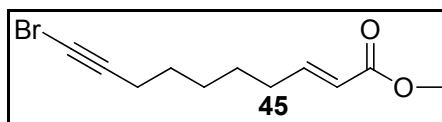
5.2.3.8 Synthese von 5-Brompent-4-in-1-ol (**43**)

Es wurde nach der generellen Methode J mit einer Ansatzgröße von 5.9 mmol vorgegangen. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (cH/EA 5:1, R_f = 0.21) gereinigt. Das Produkt **43** (357.4 mg, 2.2 mmol, 37%) konnte als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.75 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.34 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.77 (dq, J = 13.1, 6.6 Hz, 2H).

5.2.3.9 Synthese von 10-Bromdec-2-en-9-in-1-ol (**44**)

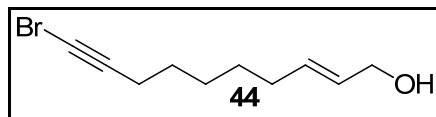
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode J mit einer Ansatzgröße von 2.5 mmol durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cH/EA 5:1, R_f = 0.20) konnte das Produkt **44** (225.4 mg, 1.0 mmol, 40%) als gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.74 – 5.59 (m, 2H), 4.10 – 4.06 (m, 2H), 2.22 – 2.16 (m, 2H), 2.09 – 2.02 (m, 2H), 1.58 – 1.48 (m, 2H), 1.42 – 1.36 (m, 4H).

5.2.3.10 Synthese von Methyl-10-bromodec-2-en-9-inoat (**45**)



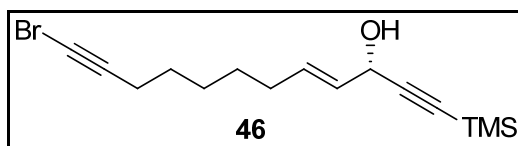
Mit einer Ansatzgröße von 9.4 mmol wurde diese Reaktion nach der generellen Methode J durchgeführt. Das Produkt **45** (1.9 g, 7.3 mmol) konnte nach einer Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, R_f = 0.34) in 78% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 6.94 (dtd, J = 15.6, 7.0, 1.7 Hz, 1H), 5.81 (dt, J = 15.6, 1.6 Hz, 1H), 3.74 – 3.65 (m, 3H), 2.24 – 2.13 (m, 4H), 1.54 – 1.39 (m, 6H).

5.2.3.11 Synthese von 10-Bromdec-2-en-9-in-1-ol (**44**)



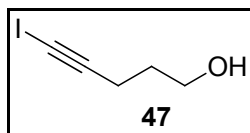
Bei dieser Substanz wurde nach der generellen Methode G in einer Ansatzgröße von 0.64 mmol vorgegangen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (cH/EA 5:1, R_f = 0.22) gereinigt. Das Produkt **44** (104.8 mg, 0.45 mmol) konnte in 70% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.74 – 5.59 (m, 2H), 4.10 – 4.06 (m, 2H), 2.22 – 2.16 (m, 2H), 2.09 – 2.02 (m, 2H), 1.58 – 1.48 (m, 2H), 1.42 – 1.36 (m, 4H).

5.2.3.12 Synthese von (S)-12-Brom-1-(trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-ol (**46**)



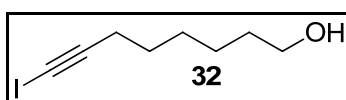
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode H mit einer Ansatzgröße von 3.5 mmol durchgeführt. Der Aldehyd (594.1 mg, 2.6 mmol) konnte in einer Ausbeute von 74% erhalten werden und wurde direkt in der folgenden Alkinilierung eingesetzt. Es wurde nach der generellen Methode I vorgegangen und eine Ansatzgröße von 0.73 mmol verwendet. Nach Aufreinigung über eine Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, R_f = 0.55) konnte das Produkt **46** (124.8 mg, 0.38 mmol, 52%) isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.87 (dtd, J = 9.3, 6.7, 1.2 Hz, 1H), 5.59 (ddt, J = 15.3, 6.1, 1.4 Hz, 1H), 4.82 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 2.22 - 2.17 (m, 2H), 2.13 - 2.05 (m, 2H), 1.59 - 1.48 (m, 2H), 1.44 - 1.36 (m, 4H), 0.18 (s, 9H).

5.2.3.13 Synthese von 5-Iodpent-4-in-1-ol (**47**)

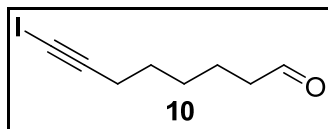


Es wurde zur Reaktionsführung die generelle Methode K mit einer Ansatzgröße von 5.9 mmol verwendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (cH/EA 5:1, R_f = 0.15) konnte das Produkt **47** (842.3 mg, 4.0 mmol, 68%) als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.74 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.50 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.81 - 1.73 (m, 2H).

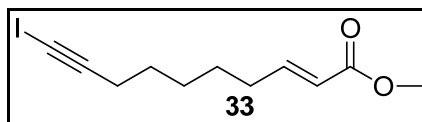
5.2.3.14 Synthese von 8-Iodoct-7-in-1-ol (**32**)



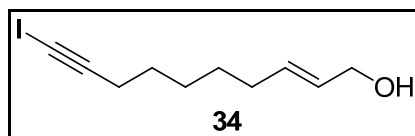
Es wurde die generelle Methode K mit einer Ansatzgröße von 23.8 mmol verwendet. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das durch Abdampfen erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (cH/EA 2:1, R_f = 0.45) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **32** (5.07 g, 20.1 mmol) konnte in 84% erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.64 - 3.60 (m, 2H), 2.37 - 2.33 (m, 2H), 1.59 - 1.48 (m, 4H), 1.44 - 1.33 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 94.58, 62.79, 60.36, 32.15, 28.46, 28.34, 25.16, 20.69; LC-MS(ESI) t_R 7.77 min, m/z 253.66 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 235.62 $[\text{M}-\text{OH}]^+$, 252.00 berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{IO}$.

5.2.3.15 Synthese von 8-Iodoct-7-inal (**10**)

Die generelle Methode E kam mit einer Ansatzgröße von 20.1 mmol zum Einsatz. Nach säulenchromatographischer Reinigung (cH/EA 9:1, $R_f = 0.30$) konnte das Produkt **10** (4.36 g, 17.4 mmol) in 87% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 9.74 (t, $J=1.7$ Hz, 1H), 2.42 (td, $J=7.2, 1.7$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 1.65 – 1.58 (m, 2H), 1.55 – 1.47 (m, 2H), 1.44 – 1.36 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 202.54, 94.40, 60.51, 43.84, 28.35, 28.29, 21.65.

5.2.3.16 Synthese von 10-Ioddec-2-en-9-inoat (**33**)

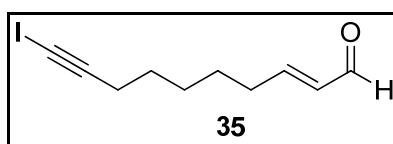
Es wurde die generelle Methode F verwendet und eine Ansatzgröße von 12.8 mmol gewählt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, $R_f = 0.47$) gereinigt. Das gewünschte Produkt **33** (3.67 g, 12.0 mmol) wurde in 94% Ausbeute erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 6.98 – 6.91 (m, 1H), 5.81 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.35 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.19 (q, $J=6.9$ Hz, 2H), 1.55 – 1.37 (m, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 167.05, 149.25, 121.01, 94.37, 60.34, 51.35, 31.96, 28.15, 27.43, 20.66, 14.16; GC-MS: t_R 46.83 min, m/z 305 (1%) $[\text{M}]^+$, 179 (100%) $[\text{M-I}]^+$, 306.01 berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{IO}_2$.

5.2.3.17 Synthese von 10-Ioddec-2-en-9-in-1-ol (**34**)

Es wurde nach der generellen Methode G vorgegangen und eine Ansatzgröße von 0.97 mmol verwendet. Die Reaktion wurde in THF mit einer DIBAL-H Lösung in Hexan durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (cH/EA 2:1, $R_f =$

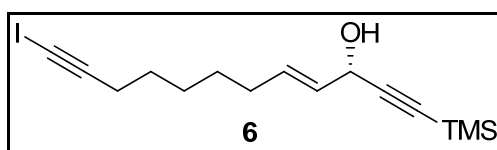
0.33) konnte das Produkt **34** (250.9 mg, 0.90 mmol, 93%) erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.73 – 5.59 (m, 2H), 4.08 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 2.35 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.03 (s, 2H), 1.53 – 1.49 (m, 2H), 1.42 – 1.37 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 133.03, 129.10, 94.63, 63.75, 60.37, 31.95, 28.48, 28.25, 28.18, 20.72; GC-MS: t_R 44.53 min, m/z 152 (9%) $[\text{M-I}]^+$, 127 (100%) $[\text{M I}]^+$, 151.11 berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}$.

5.2.3.18 Synthese von 10-Ioddec-2-en-9-inal (**35**)



Die Reaktion wurde mit einer Ansatzgröße von 10.0 mmol nach der generellen Methode H durchgeführt. Nach der Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, R_f = 0.35) des Rohproduktes konnte das Produkt **35** (2.39 g, 8.66 mmol, 87%) isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 9.80 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.83 (dt, J = 15.6, 6.8 Hz, 1H), 6.14 – 6.08 (m, 1H), 2.38 – 2.31 (m, 4H), 1.57 – 1.51 (m, 4H), 1.47 – 1.41 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 194.13, 158.32, 133.24, 94.41, 60.50, 32.64, 28.30, 28.22, 27.42, 20.79.

5.2.3.19 Synthese von (S)-12-Iod-1-(trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-ol (**6**)

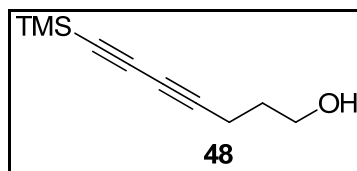


Zur Reaktionsführung wurde die generelle Methode I verwendet und eine Ansatzgröße von 0.51 mmol gewählt. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 9:1, R_f = 0.30) gereinigt und das Produkt **6** (144.2 mg, 0.38 mmol) in 76% Ausbeute und mit 96% ee Enantiomerenreinheit (berechnet durch NMR-Analyse des Mosher-Esters) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.88 – 5.80 (m, 1H), 5.59 – 5.54 (m, 1H), 4.79 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 2.33 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.51 – 1.48 (m, 2H), 1.40 – 1.37 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 134.05, 129.34, 105.09, 94.84, 90.86, 63.565, 60.61, 31.95, 28.56, 28.48,

28.43, 20.96, 0.08; GC-MS: t_R 52.56 min, m/z 373 (2%) $[M]^+$, 247 (5%) $[M-I]^+$, 125 (100%) $[M-I]^+$, 374.06 berechnet für $C_{15}H_{23}IOSi$, α_D ($c = 0.5$, EtOH) +27.6.

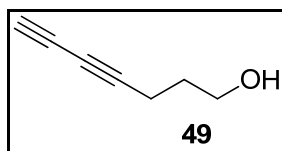
5.2.4 Kupplung beider Bausteine

5.2.4.1 Synthese von 7-(Trimethylsilyl)hepta-4,6-diin-1-ol (**48**)



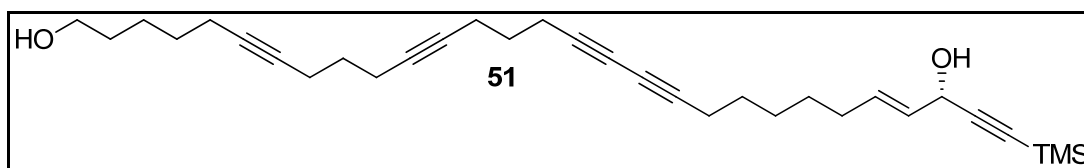
Es wurde nach der generellen Methode L mit einer Ansatzgröße von 2.1 mmol gearbeitet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cH/EA 5:1, $R_f = 0.13$) des Rohproduktes konnte das Produkt **48** (77.2 mg, 0.43 mmol) in 20% Ausbeute erhalten werden. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 3.75 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.41 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.82 – 1.74 (m, 2H), 0.20 – 0.17 (m, 9H).

5.2.4.2 Synthese von Hepta-4,6-diin-1-ol (**49**)



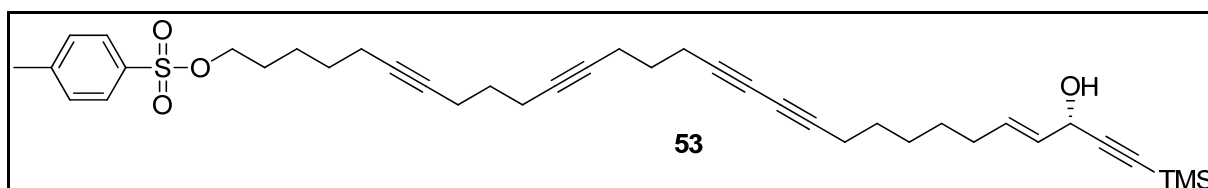
Zur Reaktionsführung wurde die generelle Methode L und eine Ansatzgröße von 4.0 mmol verwendet. Der Pd-Katalysator wurde nicht zugesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (cH/EA 5:1, $R_f = 0.07$) konnte das Produkt **49** (115.7 mg, 1.1 mmol) in 27% Ausbeute erhalten werden. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 3.75 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.45 – 2.35 (m, 2H), 1.97 (s, 1H), 1.84 – 1.74 (m, 2H); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 77.71, 68.44, 65.25, 64.89, 61.37, 30.82, 15.70.

5.2.4.3 Synthese von (S)-29-(Trimethylsilyl)nonacosa-25-en-6,11,16,18,28-pentain-1,27-diol (**51**)



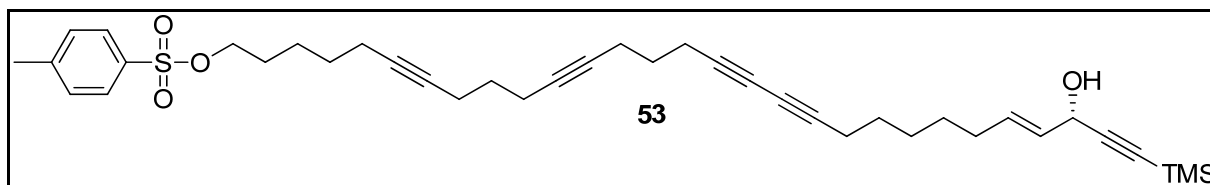
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode M in einer Ansatzgröße von 0.27 mmol durchgeführt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch (cH/EA 2:1, $R_f = 0.17$) gereinigt. Das Produkt **51** (50.6 mg, 0.12 mmol) konnte in 43% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.90 (dtd, $J = 14.9, 6.8, 1.2$ Hz, 1H), 5.61 (ddt, $J = 15.3, 6.1, 1.5$ Hz, 1H), 4.86 – 4.80 (m, 1H), 3.65 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.56 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 2.39 – 2.31 (m, 2H), 2.26 – 2.21 (m, 6H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.79 – 1.61 (m, 8H), 1.61 – 1.45 (m, 10H).

5.2.4.4 Synthese von (S)-27-Hydroxy-29-(trimethylsilyl)nonacosa-25-en-6,11,16,18,28-pentain-1-yl 4-methylbenzensulfonat (**53**)



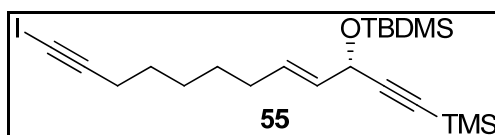
Für die Reaktion wurde die generelle Methode C mit einer Ansatzgröße von 0.1 mmol verwendet. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene eingengt und über eine Kieselgelsäule (cH/EA 5:1, $R_f = 0.23$) gereinigt. Das Produkt **53** (23.9 mg, 0.04 mmol, 37%) konnte als gelbes Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.21 (dd, $J = 15.7, 8.4$ Hz, 1H), 5.70 (dd, $J = 15.7, 1.4$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J = 14.7, 7.3$ Hz, 1H), 4.03 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.95 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.36 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.28 – 2.21 (m, 9H), 1.73 – 1.57 (m, 18H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 144.82, 144.46, 133.29, 129.96, 128.03, 111.05, 80.35, 80.27, 79.73, 79.45, 79.34, 79.01, 70.59, 65.81, 65.55, 61.50, 60.56, 38.00, 29.85, 28.65, 28.55, 28.24, 27.95, 27.06, 25.94, 24.74, 21.81, 21.23, 19.23, 18.69, 18.47, 18.04, 14.35.

5.2.4.5 Synthese von (S)-27-Hydroxy-29-(trimethylsilyl)nonacosa-25-en-6,11,16,18,28-pentain-1-yl 4-methylbenzensulfonat (**53**)



Die Reaktion wurde in einer Ansatzgröße von 0.83 mmol nach der generellen Methode M durchgeführt. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene im Vakuum eingedampft und über eine Kieselgelsäule (cH/EA 5:1, $R_f = 0.25$) gereinigt. Das Produkt **53** (383.2 mg, 0.59 mmol, 72%) konnte als gelbes Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 5.86 (ddd, $J = 7.8, 6.8, 3.4$ Hz, 1H), 5.58 (dd, $J = 15.3, 6.1$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.35 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.28 – 2.19 (m, 9H), 2.12 – 2.05 (m, 4H), 1.71 – 1.59 (m, 7H), 1.52 – 1.51 (m, 2H), 1.42 – 1.39 (m, 9H), 0.18 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 144.78, 133.93, 133.43, 129.94, 129.10, 128.02, 105.05, 90.74, 80.37, 80.25, 79.74, 79.43, 70.56, 63.48, 60.52, 31.86, 28.68, 28.56, 28.48, 28.45, 28.43, 28.26, 27.97, 24.74, 21.76, 19.28, 18.68, 18.46, 18.12, 18.04, -0.01.

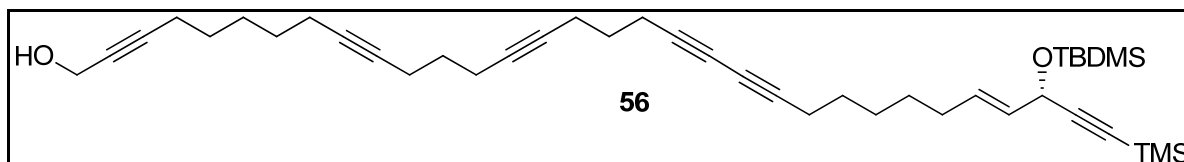
5.2.4.6 Synthese von (S)-tert-Butyl((12-iodo-1-(trimethylsilyl)dodeca-4-en-1,11-diin-3-yl)oxy)dimethylsilan (**55**)



Zu einer Lösung aus **6** (500 mg, 1.3 mmol) in DCM (5 mL) wurde bei 0°C 2,6-Lutidin (464.2 μL , 4.0 mmol, 3 eq.) und TBDMS-OTf (358.6 μL , 1.56 mmol, 1.2 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 2.5 h gerührt. EA wurde zugegeben und die organische Phase jeweils einmal mit 10%iger HCl, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit einer Kieselgelsäule (cH/EA 19:1, $R_f = 0.76$) gereinigt. Das Produkt **55** (565.6 mg, 1.16 mmol, 89%) konnte als gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.77 (dtd, $J = 10.0, 6.7, 1.4$ Hz, 1H), 5.56 – 5.44 (m, 1H), 4.85 (dd, $J = 5.5, 1.0$ Hz, 1H), 2.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.06 – 2.04 (m, 2H), 1.55 – 1.48 (m, 2H),

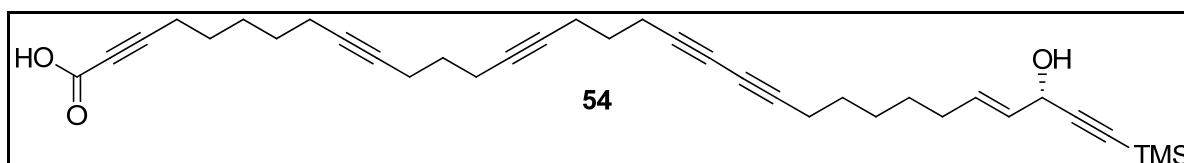
1.45 – 1.35 (m, 4H), 0.91 (s, 9H), 0.16 (s, 9H), 0.13 (d, $J = 1.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 131.86, 129.82, 106.06, 94.85, 89.81, 64.07, 31.85, 28.53, 28.49, 26.00, 25.85, 20.93, 18.53, -0.02, -2.80.

5.2.4.7 Synthese von (S)-30-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-32-(trimethylsilyl)dotriaconta-28-en-2,9,14,19,21,31-hexain-1-ol (**56**)



Es wurde die generelle Methode M mit einer Ansatzgröße von 0.29 mmol verwendet. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (cH/EA 5:1, $R_f = 0.38$) gereinigt. Das Produkt **56** (57.1 mg, 0.09 mmol) konnte in 25% Ausbeute erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.76 (dtd, $J = 15.0, 6.7, 1.3$ Hz, 1H), 5.55 – 5.44 (m, 1H), 4.84 (dd, $J = 5.5, 1.1$ Hz, 1H), 4.24 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H), 2.29 – 2.21 (m, 12H), 2.15 – 2.13 (m, 2H), 1.73 – 1.59 (m, 7H), 1.58 – 1.44 (m, 11H), 0.91 (s, 9H), 0.16 (s, 9H), 0.12 (d, $J = 1.0$ Hz, 6H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 131.86, 129.81, 106.05, 89.80, 86.51, 80.69, 80.41, 79.53, 79.45, 78.60, 77.77, 77.37, 64.06, 60.53, 51.55, 31.83, 28.71, 28.54, 28.32, 28.26, 28.19, 27.99, 27.05, 25.98, 21.18, 19.29, 18.81, 18.78, 18.51, 18.48, 18.09, 18.03, 14.33, -0.05, -4.31.

5.2.4.8 Synthese von (S)-30-Hydroxy-32-(trimethylsilyl)dotriaconta-28-en-2,9,14,19,21,31-hexainsäure (**54**)

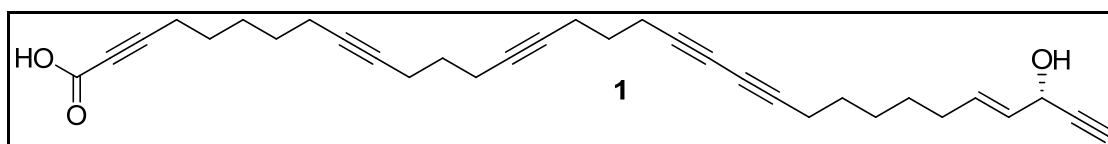


Die Reaktion wurde nach der generellen Methode M mit einer Ansatzgröße von 1.0 mmol durchgeführt. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (DCM/ MeOH 9:1 +0.1% Essigsäure, $R_f = 0.32$) und anschließend über eine C18-Kieselgelsäule ($\text{H}_2\text{O} + 60\%$ AcN, $R_f = 0.18$) aufgereinigt. Das Produkt **54** (38.3 mg, 0.07 mmol) konnte in 7% Ausbeute isoliert werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.91 – 5.86 (m, 1H), 5.63 – 5.57 (m, 1H), 4.85 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 2.38 – 2.35 (m, 2H), 2.27

– 2.22 (m, 10H), 2.17 – 2.13 (m, 2H), 2.08 – 2.07 (m, 2H), 1.72 – 1.62 (m, 4H), 1.54 – 1.41 (m, 12H), 0.18 (s, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 153.48, 133.97, 129.01, 105.05, 90.81, 86.70, 80.44, 79.45, 77.67, 77.36, 76.74, 68.36, 65.96, 65.88, 65.53, 63.50, 31.90, 38.97, 28.81, 28.69, 28.49, 28.47, 28.29, 28.01, 19.28, 18.88, 18.49, 18.15, 18.03, 0.02; LC-MS (ESI): t_R 52.56 min, m/z 373 (2%) $[\text{M}]^+$, 247 (5%) $[\text{M}-\text{I}]^+$, 125 (100%) $[\text{M I}]^+$, 374.06 berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{IOSi}$.

5.2.4.9 Synthese von (S)-30-Hydroxydotriaconta-28-en-2,9,14,19,21,31-hexainsäure

(1)



Zu einer Lösung aus **54** (25.5 mg, 0.05 mmol) in Methanol (1 mL) wurde eine 1 M NaOH-Lösung (50 μL , 0.05 mmol, 1.05 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (DCM/ MeOH 3:1, R_f = 0.89) aufgereinigt. Der gewünschte Naturstoff **1** (16.7 mg, 0.035 mmol) konnte in 71% Ausbeute erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.90 – 5.86 (m, 1H), 5.59 (dd, J = 15.3, 6.2 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.37 (s, 1H), 2.37 (dt, J = 7.1 Hz, 4H), 2.27 (q, J = 7.1 Hz, 8H), 2.19 – 2.17 (m, 2H), 2.12 – 2.11 (m, 2H), 1.70 – 1.66 (m, 2H), 1.65 – 1.51 (m, 10H), 1.46 – 1.45 (m, 4H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 164.87, 133.90, 130.82, 90.52, 84.75, 81.21, 81.05, 80.36, 80.26, 80.15, 78.03, 77.67, 77.06, 74.52, 66.75, 66.33, 63.14, 36.97, 32.81, 31.67, 29.76, 29.69, 29.56, 29.38, 29.14, 28.71, 19.65, 19.27, 19.12, 18.82, 18.57, 18.51, 18.48; LC-MS (ESI): t_R 52.56 min, m/z 373 (2%) $[\text{M}]^+$, 247 (5%) $[\text{M}-\text{I}]^+$, 125 (100%) $[\text{M I}]^+$, 374.06 berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{IOSi}$, α_D (c = 0.5, EtOH) +5.8.

5.3 Synthese der Phosphonatsonden

5.3.1 Generelle Methoden

5.3.1.1 Generelle Methode A: Hydrolyse des Phosphonates zur freien Säure

Zu einer Lösung des Phosphonates (1 eq.) in DCM wurde bei 0°C Oxalylchlorid (2 M in DCM, 3.7 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt, wobei sich die Lösung auf RT erwärmen konnte. Das Lösungsmittel wurde in einem Strom von N₂ entfernt. Nach Zugabe von Wasser (1.4 mL) wurde die Reaktionslösung für weitere 5 min gerührt und anschließend mit DCM extrahiert. Das Produkt konnte nach Trocknung der organischen Phase über Na₂SO₄ und entfernen des Lösungsmittels erhalten werden.

5.3.1.2 Generelle Methode B: Fluorierung mit DAST

Eine Lösung der freien Phosphorsäure (1 eq.) in DCM (0.075M) wurde auf -78°C gekühlt und DAST (6 eq.) wurde langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 40 min gerührt und auf RT erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im N₂-Strom entfernt. Das Produkt konnte nach Kieselgel-chromatographischer Reinigung des Rückstandes erhalten werden.

5.3.1.3 Generelle Methode C: Amid-Kupplung über Hydroxysuccinimid-aktivierte Säuren

Zu einer Lösung des Hydroxysuccinimids (1 eq.) in MeOH wurde das Amin (1.5 eq.) und NaHCO₃ (0.3 eq.) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde in einem N₂-Strom entfernt, der verbliebene Rückstand in DCM gelöst und in einen neuen Kolben überführt, um das nicht lösliche NaHCO₃ zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft und der zurückbleibende Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

5.3.1.4 Generelle Methode D: Chlorierung am Phosphor

Zu einer Lösung des Phosphonats (1 eq.) in DCM wurde Oxalylchlorid (20 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung bei RT über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im N₂-Strom entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt.

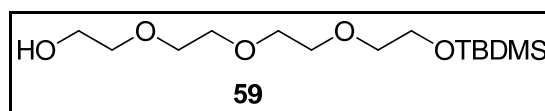
5.3.1.5 Generelle Methode E: Darstellung eines Phosphonates aus einem Chlorophosphonat

Zu einer Lösung des chlorierten Phosphonates (1 eq.) in Toluol wurde eine Lösung des Alkohols (2 eq.) und NEt_3 (5 eq.) in Toluol gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3h bei RT gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung des Rückstandes erhalten werden.

5.3.1.6 Generelle Methode F: Click-Reaktion

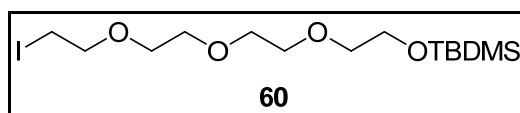
Eine Lösung aus dem Azid (1 eq.), dem Alkin (1 eq.), CuSO_4 (5 mM in Wasser, 0.25 eq.), TCEP (50 mM in Wasser) und TBTA (100 mM in DMSO, 0.5 eq.) in Wasser wurde über Nacht bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt nach einer RP-C18-Kieselgelsäule-Reinigung (H_2O / AcN) erhalten.

5.3.2 Synthese von 2,2,3,3-Tetramethyl-4,7,10-13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-ol (59)



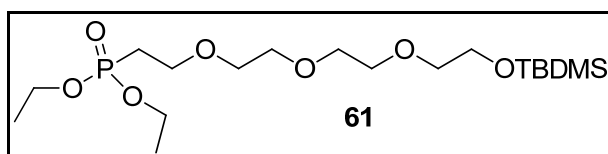
Zu einer Lösung aus Tetraethylenglykol (**58**, 8.9 mL, 1 eq, 51.5 mmol) in DCM (80 ml) wurde TBDMS-Cl (7.8 g, 51.5 mmol, 1 eq.) und Imidazol (7.0 g, 103 mmol, 2 eq) gegeben und über Nacht bei RT gerührt, wobei sich ein weißer Feststoff bildete. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaHCO_3 gestoppt und zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene eingedampft und der Rückstand anschließend über eine Kieselgelsäule (cH/EA 1:2, $R_f = 0.23$) aufgereinigt. Das Produkt **59** (6.7 g, 22.1 mmol, 43%) konnte als gelbliche Flüssigkeit isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 3.75 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.65 (d, $J=4.3$ Hz, 8H), 3.59 (m, 2H), 3.54 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 72.6, 70.81, 70.47, 62.83, 61.85, 26.05, 18.50, -5.15; ESI-MS: t_R 4.21 min, m/z 308.87 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 308.20 berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Si}$.

5.3.3 Synthese von 15-Iodo-2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan (**60**)



Zu einer Lösung aus **59** (6.0 g, 19.7 mmol) in Toluol (150 mL) wurden nacheinander PPh₃ (25.8 g, 98.5 mmol, 5 eq), I₂ (20.0 g, 78.8 mmol, 4.5 eq) und Imidazol (7.0 g, 102.4 mmol, 5.2 eq) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 1.5 h bei RT gerührt, wobei sich eine heterogene orange-braune Lösung bildete. Der Feststoff wurde abfiltriert und mehrmals mit EA gewaschen. Nach Zugabe von ges. Na₂S₂O₃-Lösung wurden die Phasen getrennt und die organische Phase jeweils einmal mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wurde eine säulenchromatographische Reinigung (CH/EA 5:1, R_f = 0.31) des durch Abdampfen der Lösungsmittel erhaltenen Rückstandes vorgenommen. Das Produkt **60** (6.3 g, 15.1 mmol, 77%) konnte als leicht gelbliches Öl isoliert werden. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 3.78-3.73 (m, 4H), 3.65 (d, J=2.2 Hz, 8H), 3.55 (t, J=5.4 Hz, 2H), 3.25 (t, J=7.0 Hz, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 72.80, 72.12, 70.87, 70.75, 70.37, 26.07, 18.51, 3.05, -5.11; ESI-MS: t_R 4.31 min, m/z 419.20 [M+H]⁺, 418.10 berechnet für C₁₄H₃₂IO₄Si.

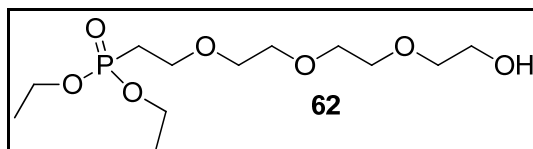
5.3.4 Synthese von Diethyl-(2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-yl)-phosphonat (**61**)



Eine Lösung aus **60** (5.5 g, 13.1 mmol) und P(OEt)₃ (12.4 ml, 71 mmol, 5.4 eq) wurde auf 150°C erwärmt und die Reaktionsmischung für 1h gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf RT abgekühlt und das überschüssige P(OEt)₃ im Vakuum (2.3 * 10⁻² mmbar, 80 °C) abdestilliert. Die folgende säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH 50:1, R_f = 0.4) des Rückstandes ergab das Produkt **61** (5.1 g, 12.0 mmol, 91%) als gelbliche Flüssigkeit. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 4.14 – 4.03 (m, 4H), 3.73 (ddd, J= 10.6, 8.0, 4.1 Hz, 4H), 3.65 – 3.58 (m, 8H), 3.54 (t, J= 5.4

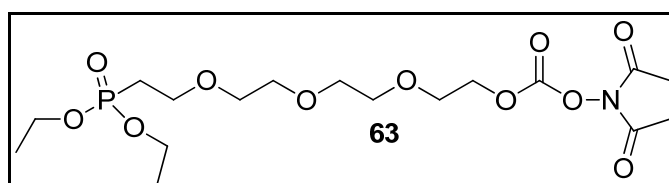
Hz, 2H), 2.16 – 2.07 (m, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 6H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 72.78, 70.85, 70.60, 70.32, 65.26, 62.82, 61.75, 27.80, 26.42, 26.05, 16.59, -5.13; ^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 29.59; ESI-MS: t_R 4.32 min, m/z 429.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 428.24 berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{PSi}$.

5.3.5 Synthese von Diethyl(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)phosphonat (**62**)



Zu einer Lösung aus **61** (5.1 g, 12.0 mmol) in THF (150 mL) wurde bei 0 °C TBAF (13.1 mL, 16.9 mmol, 1.0 M in THF, 1.25 eq) langsam zugegeben und die Reaktionsmischung unter Erwärmen auf RT über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser gestoppt und dreimal mit DCM extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 19:1, $R_f = 0.29$). Das Produkt **62** (2.8 g, 8.8 mmol, 73%) wurde als gelbliches Öl erhalten. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.13-4.03 (m, 4H), 3.75-3.57 (m, 14 H), 2.12 (dt, $J = 18.8, 7.6$ Hz, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 72.65, 70.72, 70.45, 70.24, 65.26, 61.80, 27.73, 26.35, 16.56; ESI-MS: t_R 4.31 min, m/z 315.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 314.15 berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_7\text{P}$.

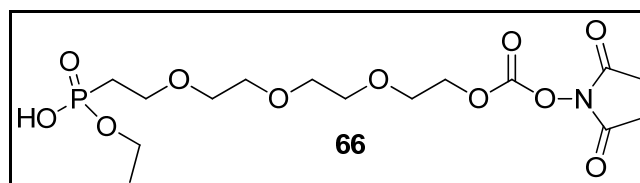
5.3.6 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**63**)



Zu einer Lösung aus **62** (2.0 g, 6.4 mmol) in DMF (18.7 mL, 0.35 M) wurde N,N' -Disuccinimidylcarbonat (3.6 g, 14.1 mmol, 2.2 eq) und NEt_3 (2.2 mL, 16.0 mmol, 2.5 eq) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt.

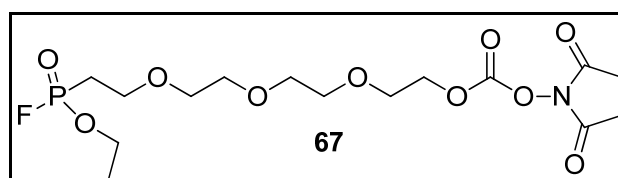
Die Reaktionslösung wurde anschließend mit Wasser und DCM verdünnt, die Phasen getrennt, die organische Phase dreimal mit ges. NaCl Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Aufreinigung des durch Abdampfen des Lösungsmittels entstandenen Rückstandes über eine Kieselgelsäule (DCM/MeOH 50:1, R_f = 0.25) wurde das Produkt **63** (1.44 g, 3.2 mmol) in 49% Ausbeute erhalten. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 4.45 – 4.42 (m, 2H), 4.12 – 4.03 (m, 4H), 3.79 – 3.57 (m, 12H), 2.82 (s, 4H), 2.11 (dt, J = 18.7, 7.6 Hz, 2H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 168.68, 151.72, 70.96, 70.67, 70.31, 68.42, 65.19, 61.75, 27.71, 25.56, 16.55; ESI-MS: t_R 4.21 min, m/z 456.20 [M+H]⁺, 455.16 berechnet für C₁₇H₃₀NO₁₁P.

5.3.7 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxy(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat (**66**)



Die Reaktion wurde nach der generellen Methode A mit einer Ansatzgröße von 0.49 mmol durchgeführt. Das Produkt **66** (206.6 mg, 0.48 mmol, 99%) wurde als braunes Öl erhalten. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ / ppm: 4.53 – 4.18 (m, 2H), 4.11 – 4.02 (m, 2H), 3.73 – 3.59 (m, 12H), 2.71 – 2.55 (m, 4H), 2.10 (dt, J = 18.7, 7.5 Hz, 2H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

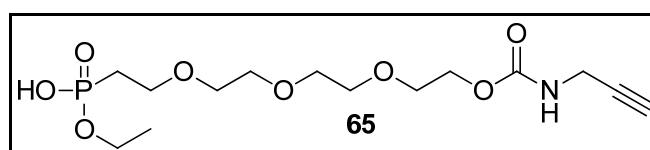
5.3.8 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxyfluorophosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat (**67**)



Es wurde nach der generellen Methode B mit einer Ansatzgröße von 0.23 mmol vorgegangen. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ und

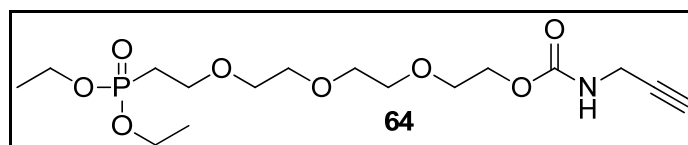
Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum konnte das Produkt **67** (120.9 mg, 0.23 mmol, >98%) als gelblich-braunes Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.49 – 4.42 (m, 2H), 4.30 – 4.22 (m, 2H), 3.83 – 3.74 (m, 4H), 3.67 – 3.62 (m, 8H), 2.83 (s, 4H), 2.36 – 2.20 (m, 2H), 1.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 29.26 (d, $J = 1065.1$ Hz); $^{19}\text{F-NMR}$ (377 MHz, CDCl_3): δ / ppm: -61.82 (d, $J = 1065.6$ Hz).

5.3.9 **Synthese** **von** **2-(2-(2-(2-(Ethoxy(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbammat (65)**



Es wurde zur Reaktionsführung die generelle Methode C mit einer Ansatzgröße von 0.06 mmol verwendet. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (DCM / MeOH 9:1 zu MeOH) gereinigt. Das Produkt **65** (12.9 mg, 0.04 mmol) konnte in 59% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 4.24 – 4.20 (m, 4H), 3.96 – 3.87 (m, 2H), 3.76 – 3.60 (m, 12H), 2.53 (s, 1H), 1.90 (dt, $J = 17.1, 7.0$ Hz, 2H), 1.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

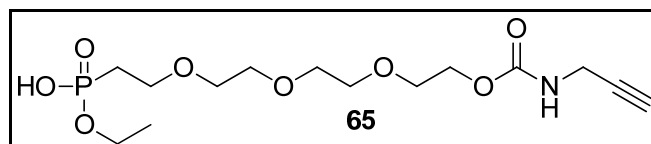
5.3.10 **Synthese von 2-(2-(2-(2-(Diethoxyphosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl prop-2-in-1-ylcarbammat (64)**



Zur Reaktionsführung wurde die generelle Methode C verwendet und die Ansatzgröße 0.89 mmol gewählt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (CHCl_3 / MeOH 19:1, $R_f = 0.46$) aufgereinigt. Das Produkt **64** (281.1 mg, 0.71 mmol, 80%) wurde als gelbes Öl erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.26 – 4.21 (m, 2H), 4.14 – 4.04 (m, 4H), 3.95 (s, 2H), 3.76 – 3.59 (m, 12H), 2.22 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 2.12 (dt, $J = 18.7, 7.5$ Hz, 2H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 162.72, 79.94,

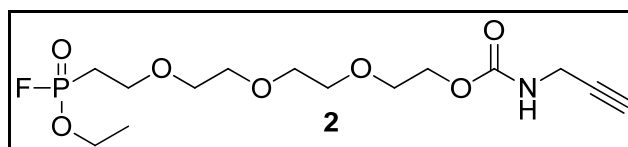
71.50, 70.70, 70.31, 69.62, 65.23, 64.41, 61.85, 30.85, 27.77, 16.58; LC-MS (ESI): t_R 7.19 min, m/z 396.00 $[M+H]^+$, 395.17 berechnet für $C_{16}H_{30}NO_8P$.

5.3.11 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxy(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbammat (**65**)



Die Reaktion wurde nach der generellen Methode A mit einer Ansatzgröße von 0.25 mmol durchgeführt. Das Produkt **65** (54.5 mg, 0.15 mmol) konnte in 59% Ausbeute erhalten werden. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 4.49 – 4.17 (m, 2H), 4.13 – 3.89 (m, 4H), 3.80 – 3.69 (m, 2H), 3.68 – 3.55 (m, 10H), 2.20 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 2.18 – 2.06 (m, 2H), 1.32 - 1.29 (m, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 161.86, 77.36, 71.35, 70.71, 70.64, 70.55, 70.09, 68.87, 66.72, 65.01, 53.58, 30.20, 26.49, 16.45; ^{31}P -NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 31.87; LC-MS (ESI): t_R 5.64 min, m/z 367.37 $[M+H]^+$, 367.14 berechnet für $C_{14}H_{26}NO_8P$.

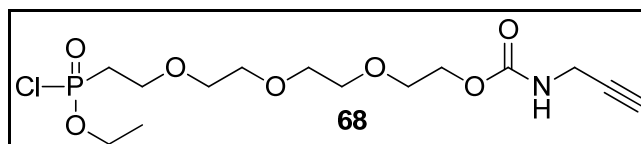
5.3.12 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxyfluorophosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbammat (**2**)



Es wurde nach der generellen Methode B mit einer Ansatzgröße von 0.05 mmol vorgegangen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($CHCl_3$ zu 10% MeOH). Das Produkt **2** (11.5 mg, 0.03 mmol, 62%) wurde als braunes Öl erhalten. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 4.48 – 4.43 (m, 2H), 4.39 - 4.38 (m, 2H), 4.28 – 4.21 (m, 2H), 3.79 – 3.72 (m, 4H), 3.65 – 3.61 (m, 8H), 2.30 – 2.19 (m, 2H), 2.18 – 2.16 (m, 1H), 1.35 (t, J = 7.1 Hz, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 164.47, 82.90, 73.71, 73.47, 71.94, 71.57, 70.79, 70.75, 70.65, 69.06, 53.85, 36.05, 29.84, 17.64; ^{31}P -NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ / ppm: 29.12 (d, J = 1065.8 Hz);

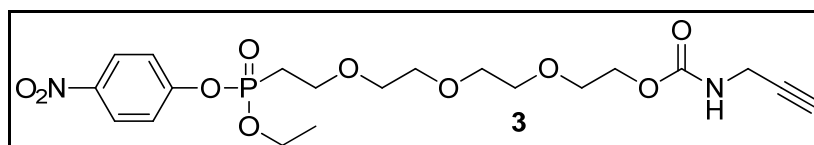
^{19}F -NMR (377 MHz, CDCl_3): δ / ppm: -61.71 (d, J = 1066.9 Hz); LC-MS (ESI): t_R 7.39 min, m/z 369.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 369.14 berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{FNO}_6\text{P}$.

5.3.13 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Chloro)ethoxy)phosphory)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (68)



Die Reaktion wurde nach der generellen Methode D mit einer Ansatzgröße von 0.2 mmol durchgeführt. Das Produkt **68** (76.4 mg, 0.19 mmol, 98%) wurde ohne weitere Aufreinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.51 – 4.45 (m, 3H), 4.42 – 4.18 (m, 3H), 3.89 – 3.75 (m, 4H), 3.69 – 3.61 (m, 8H), 2.53 (dt, J = 18.1, 7.4 Hz, 2H), 2.32 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.39 (t, J = 7.1 Hz, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 152.06, 76.37, 72.99, 70.79, 70.67, 70.56, 68.40, 68.08, 64.62, 35.41, 33.24, 16.11; ^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 40.56.

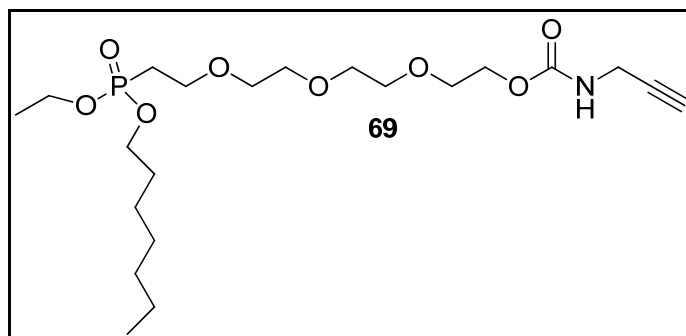
5.3.14 Synthese von 2-(2-(2-(2-(ethoxy(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (3)



Es wurde nach der generellen Methode E gearbeitet und eine Ansatzgröße von 0.19 mmol gewählt. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (CHCl_3 / MeOH 50:1, R_f = 0.12) gereinigt. Das Produkt **3** (38.7 mg, 0.08 mmol) konnte in 40% Ausbeute erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 8.23 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.30 – 4.14 (m, 4H), 3.96 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.87 – 3.77 (m, 2H), 3.69 – 3.65 (m, 2H), 3.61 (d, J = 6.5 Hz, 8H), 2.33 (dt, J = 18.6, 7.1 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 155.67, 155.29, 144.69, 125.77, 121.28, 78.86, 71.61, 70.68, 70.53, 69.63, 64.75, 64.43,

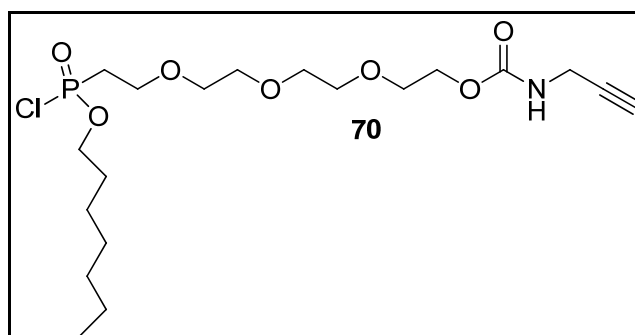
63.36, 30.90, 28.17, 16.51; ^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 27.96; LC-MS (ESI): t_R 8.58 min, m/z 489.00 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 488.16 berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}$.

5.3.15 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Ethoxy(heptyloxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (69)



Die Reaktion wurde nach der generellen Methode E mit einer Ansatzgröße von 0.25 mmol durchgeführt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene im Vakuum eingedampft und der Rückstand mittels einer Kieselgelsäule (DCM/MeOH 9:1, R_f = 0.75) aufgereinigt. Das Produkt **69** (45.3 mg, 0.10 mmol) konnte in 39% Ausbeute erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.27 – 4.22 (m, 8H), 4.14 – 4.06 (m, 8H), 4.05 – 3.95 (m, 16H), 3.77 – 3.66 (m, 19H), 3.65 – 3.59 (m, 34H), 2.22 (t, J = 2.5 Hz, 4H), 2.17 – 2.09 (m, 9H), 1.69 – 1.61 (m, 8H), 1.35 – 1.26 (m, 41H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 11H).

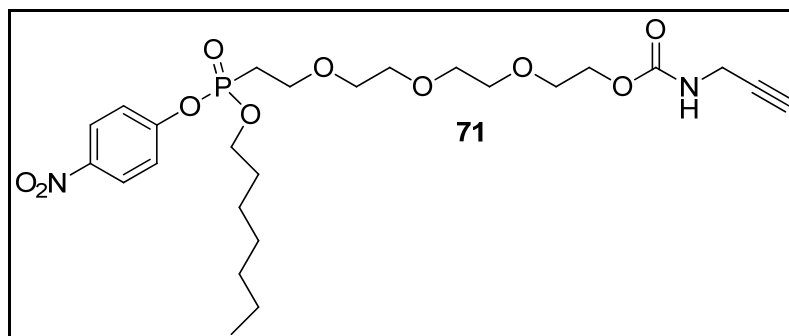
5.3.16 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Chloro(heptyloxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (70)



Es wurde die generelle Methode D mit einer Ansatzgröße von 0.16 mmol verwendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Produkt **70** im Hochvakuum

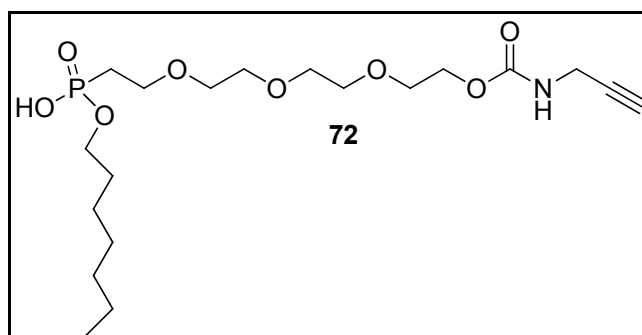
getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung und Analyse in der folgenden Reaktion eingesetzt.

5.3.17 Synthese von 2-(2-(2-(2-((Heptyloxy)(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbammat (71)



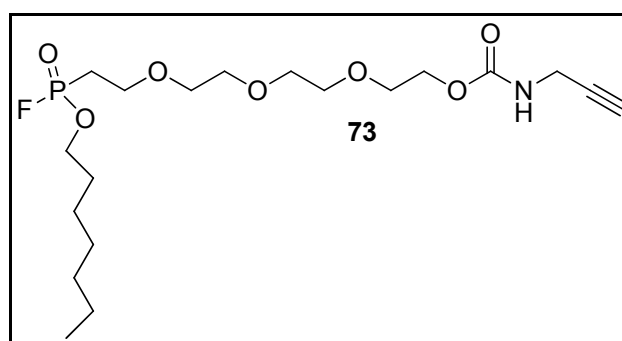
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode E mit einer Ansatzgröße von 0.16 mmol durchgeführt. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde eine Kieselgelsäule (DCM / MeOH 50:1, $R_f = 0.12$) zur Aufreinigung des durch Abdampfen im Vakuum erhaltenen Rückstandes durchgeführt. Das Produkt **71** (19.6 mg, 0.04 mmol) konnte in 22% Ausbeute erhalten werden. ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 8.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.55 – 7.49 (m, 2H), 4.52 – 4.17 (m, 4H), 3.93 – 3.76 (m, 4H), 3.74 – 3.64 (m, 10H), 2.60 (s, 1H), 2.45 (dtd, $J = 18.3, 6.7, 2.4$ Hz, 2H), 1.78 – 1.61 (m, 2H), 1.39 – 1.31 (m, 8H), 0.93 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 29.38.

5.3.18 Synthese von 2-(2-(2-(2-((Heptyloxy)(hydroxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbammat (72)



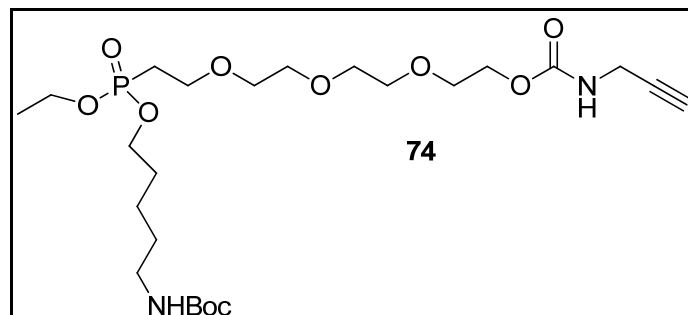
Es wurde nach der generellen Methode A mit einer Ansatzgröße von 0.05 mmol vorgegangen. Das Produkt **72** (12.3 mg, 0.03 mmol, 54%) konnte ohne weitere Aufarbeitung als gelbes Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 4.14 – 3.99 (m, 4H), 3.86 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.64 – 3.59 (m, 12H), 2.55 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 2.17 – 2.07 (m, 2H), 1.69 – 1.63 (m, 2H), 1.33 – 1.29 (m, 8H), 0.90 (t, J = 6.8 Hz, 3H).

5.3.19 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Fluoro(heptyloxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-yn-1-ylcarbammat (73**)**



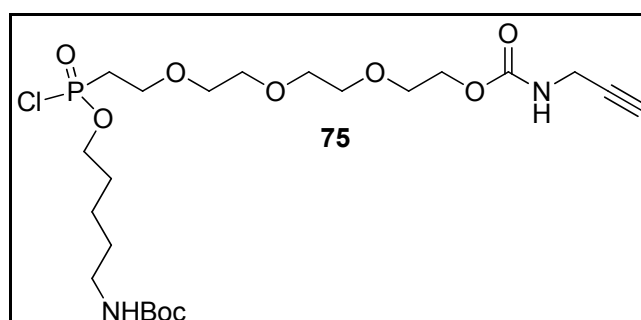
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode B mit einer Ansatzgröße von 0.03 mmol durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CHCl_3 zu 10% MeOH, R_f = 0.24) konnte das Produkt **73** (3.76 mmol, 0.009 mmol, 29%) als gelbes Öl erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.30 – 3.99 (m, 4H), 3.82 – 3.78 (m, 2H), 3.77 – 3.68 (m, 4H), 3.67 – 3.58 (m, 8H), 2.34 – 2.22 (m, 2H), 2.18 – 2.07 (m, 1H), 1.75 – 1.61 (m, 2H), 1.38 – 1.25 (m, 12H), 0.90 – 0.87 (m, 3H); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 29.06 (d, J = 1065.6 Hz); $^{19}\text{F-NMR}$ (377 MHz, CDCl_3): δ / ppm: -62.07 (d, J = 1065.9 Hz).

5.3.20 Synthese von 2-(2-(2-(2-(((5-((tert-Butoxycarbonyl)amino)pentyl)oxy)(ethoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbammat (74)



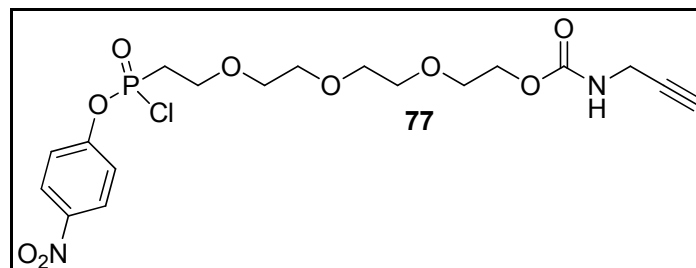
Es kam hier die generelle Methode E mit einer Ansatzgröße von 0.13 mmol zum Einsatz. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (DCM / MeOH 9:1, $R_f = 0.57$) gereinigt. Das Produkt **74** (55.8 mg, 0.1 mmol) konnte in 78% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.32 - 4.23 (m, 2H), 4.12 - 3.96 (m, 6H), 3.78 - 3.58 (m, 14H), 3.13 - 3.09 (m, 2H), 2.22 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 2.17 - 2.08 (m, 2H), 1.59 - 1.48 (m, 6H), 1.41 - 1.27 (m, 11H); LC-MS (ESI): t_R 7.21 min, m/z 575.27 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 552.28 berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}$.

5.3.21 Synthese von 2-(2-(2-(2-(((5-((tert-Butoxycarbonyl)amino)pentyl)oxy)chlorophosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbammat (75)



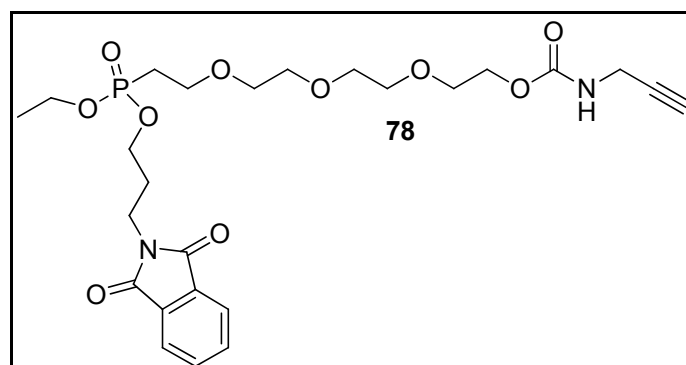
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode D durchgeführt und eine Ansatzgröße von 0.1 mmol verwendet. Das Produkt **75** wurde ohne weitere Aufarbeitung, Reinigung und Analyse in der folgenden Reaktion eingesetzt.

5.3.22 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Chloro(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (77)



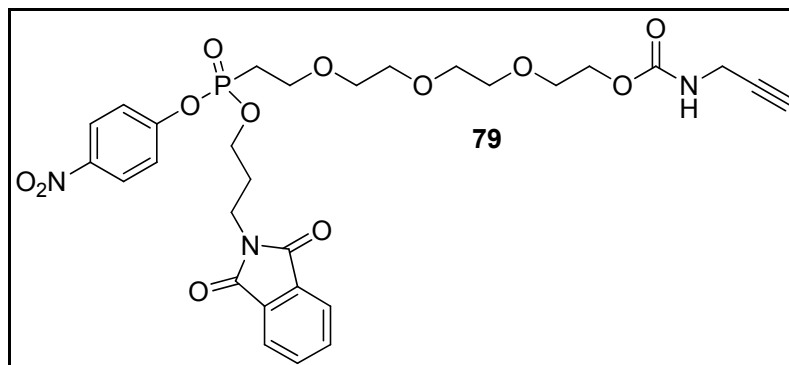
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode D mit einer Ansatzgröße von 0.22 mmol durchgeführt. Das Produkt **77** wurde ohne weitere Aufreinigung und Analyse in der folgenden Reaktion eingesetzt.

5.3.23 Synthese von 2-(2-(2-(2-((3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)propoxy)(ethoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (78)



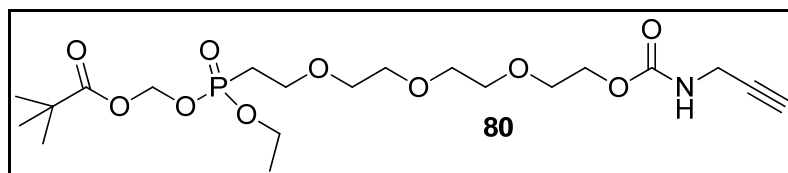
Die Reaktion wurde nach der generellen Methode E mit einer Ansatzgröße von 0.25 mmol durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde in einem N₂-Strom entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (CHCl₃ / MeOH 19:1, R_f = 0.03) gereinigt. Das Produkt **78** (87.3 mg, 0.16 mmol) konnte in 63% Ausbeute erhalten werden. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 7.84 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H), 7.72 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 2H), 4.13 – 4.08 (m, 4H), 3.98 – 3.93 (m, 2H), 3.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.77 – 3.59 (m, 12H), 2.22 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.18 – 2.01 (m, 4H), 1.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ / ppm: 168.38, 156.19, 134.16, 132.22, 123.41, 79.99, 77.36, 71.52, 70.74, 70.67, 70.35, 69.65, 65.16, 64.45, 63.23, 61.95, 34.98, 30.87, 29.67, 29.60, 27.74, 26.36, 16.52; LC-MS (ESI): t_R 7.60 min, *m/z* 556.77 [M+H]⁺, 578.73 [M + Na]⁺, 554.20 berechnet für C₂₅H₂₅N₂O₁₀P.

5.3.24 Synthese von 2-(2-(2-(2-((3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)propoxy)(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-in-1-ylcarbamat (**79**)



Die Chlorierung wurde nach der generellen Methode D durchgeführt. Es wurde ein Ansatz von 0.16 mmol gewählt. Die folgende Kupplungsreaktion wurde nach der generellen Methode E durchgeführt. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (CHCl_3 / MeOH 19:1, $R_f = 0.11$) und anschließend über eine C18-Kieselgelsäule (60% AcN, $R_f = 0.4$) gereinigt. Das Produkt **79** (7.9 mg, 0.012 mmol) konnte in 8% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 8.22 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.85 – 7.83 (m, 2H), 7.74 -7.72 (m, 2H), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.27 – 3.62 (m, 20H), 2.36 -2.07 (m, 5H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 168.35, 144.80, 134.28, 132.13, 125.83, 123.48, 121.37, 79.93, 71.62, 70.74, 70.63, 69.72, 64.77, 64.50, 34.77, 30.96, 29.47, 29.36; LC-MS (ESI): t_R 7.68 min, m/z 647.03 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 669.03 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 647.19 berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{P}$.

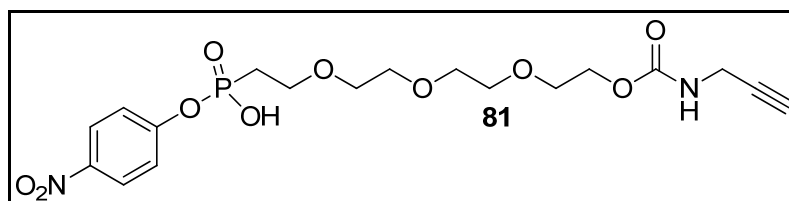
5.3.25 Synthese von ((Ethoxy(13-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-14-azaheptadec-16-in-1-yl)phosphoryl)oxy)methyl-pivalat (**80**)



Zu einer Lösung aus **65** (67.4 mg, 0.18 mmol) in DMF (0.5 mL) wurde Chlorotrimethylpivalat (129.7 μL , 0.9 mmol, 5 eq.) und NEt_3 (49.9 μL , 0.36 mmol, 2 eq.) gegeben und über Nacht bei 60°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM / MeOH 50:1 zu MeOH) gereinigt. Das Produkt **80** (3.6 mg, 0.007 mmol) konnte in 4% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 5.70 – 5.63 (m, 2H), 4.28 –

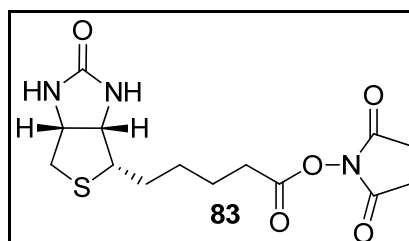
3.94 (m, 6H), 3.70 – 3.59 (m, 12H), 2.25 – 2.12 (m, 3H), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.23 (s, 9H); LC-MS (ESI): t_R 6.89 min, m/z 482.12 $[M+H]^+$, 481.21 berechnet für $C_{20}H_{36}NO_{10}P$.

5.3.26 Synthese von 2-(2-(2-(2-(Hydroxy(4-nitrophenoxy)phosphoryl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-prop-2-yn-1-ylcarbamat (**81**)



Zu einer Lösung aus **3** (44.6 mg, 0.09 mmol) in DCM (0.5 mL) wurde Bromotrimethylsilan (59.4 μ L, 0.45 mmol, 5 eq.) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde Wasser (150 μ L) zugegeben und erneut über Nacht bei RT gerührt. Es wurde dreimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das durch Abdampfen im Vakuum erhaltene Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (DCM / MeOH 9:1 zu 100% MeOH, $R_f = 0.46$) gereinigt. Das Produkt **81** (31.3 mg, 0.06 mmol) konnte in 76% Ausbeute erhalten werden. 1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ / ppm: 8.20 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.91 – 3.77 (m, 4H), 3.69 – 3.56 (m, 10H), 2.53 (s, 1H), 2.13 – 2.03 (m, 2H); ^{31}P -NMR (162 MHz, MeOD): δ / ppm: 19.43; LC-MS (ESI): t_R 4.93 min, m/z 461.36 $[M+H]^+$, 483.15 $[M+Na]^+$, 460.12 berechnet für $C_{18}H_{25}N_1O_{10}P$.

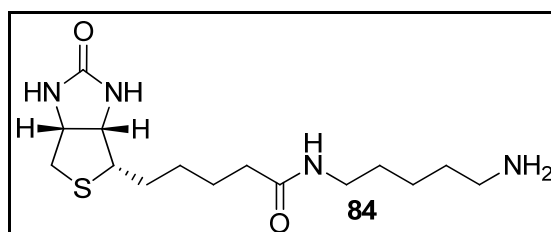
5.3.27 Synthese des Biotin-NHS-Esters (**83**)



Zu einer Lösung aus Biotin (**82**, 1.0 g, 4.09 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (612.4 mg, 5.3 mmol, 1.3 eq.) in DMF (24 mL) wurde langsam DCC (843.9 mg, 4.09 mmol, 1 eq.) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 24 h bei RT gerührt. Der

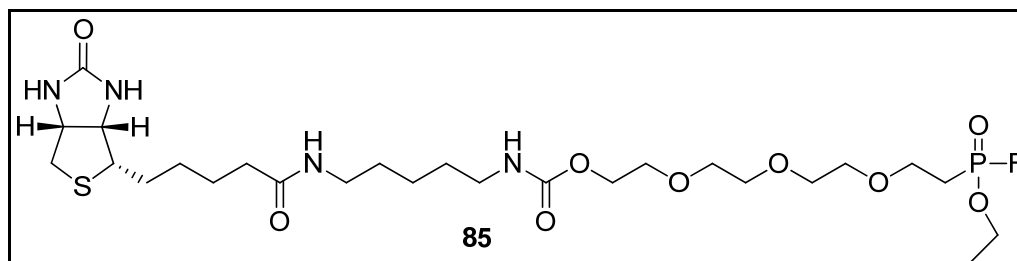
entstandene Feststoff wurde abfiltriert und die Lösung für 2 Tage in den Kühlschrank gestellt. Der erneut ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit DEE gewaschen und mit Isopropanol umkristallisiert. Das Produkt **83** (963.3 mg, 2.8 mmol, 69%) konnte als weißer Feststoff erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ / ppm: 4.34 – 4.31 (m, 1H), 4.19 – 4.14 (m, 1H), 3.18 – 3.06 (m, 1H), 2.89 – 2.78 (m, 5H), 2.69 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.60 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 1.75 – 1.61 (m, 3H), 1.59 – 1.35 (m, 3H); LC-MS (ESI): t_R 6.21 min, m/z 342.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 364.27 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 341.10 berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$.

5.3.28 Synthese von Biotinpentanamin (**84**)



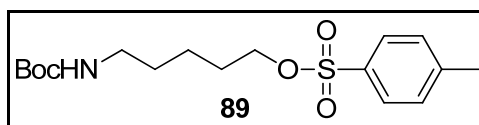
Zu einer Lösung aus **83** (800 mg, 2.3 mmol) in DMF (11.5 mL) wurde eine Lösung aus 1,5-Pentandiamin (1.1 mL, 9.2 mmol, 4 eq.) in DMF (6.9 mL) langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 3h bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde dreimal mit EtOH (60 mL) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **84** (662.0 mg, 2.02 mmol, 88%) konnte als weißer Feststoff erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ / ppm: 4.34 – 4.25 (m, 1H), 4.18 – 4.07 (m, 1H), 3.14 – 3.05 (m, 1H), 3.00 (dd, J = 12.8, 6.7 Hz, 3H), 2.82 (dd, J = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 2.57 (d, J = 12.5 Hz, 2H), 2.04 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.65 – 1.56 (m, 2H), 1.55 – 1.42 (m, 4H), 1.40 – 1.22 (m, 6H).

5.3.29 Synthese von FP-Biotin (**85**)



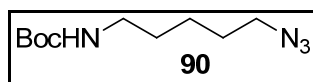
Eine Lösung aus **67** (63.8 mg, 0.15 mmol) und **84** (73.2 mg, 0.22 mmol, 1.5 eq.) in DMF (2.1 mL) wurde bei RT gerührt. Nach LC-MS Kontrolle wurde die Reaktion nach 5.5 h beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde mit DEE und EA gewaschen, in CHCl_3 gelöst und in einen neuen Kolben überführt. Das Lösen und Überführen wurde noch zweimal wiederholt. Das Produkt **85** (16.7 mg, 0.03 mmol) konnte in 13% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.36 – 4.17 (m, 2H), 3.91 – 3.57 (m, 14H), 3.26 – 2.80 (m, 3H), 2.68 – 2.46 (m, 4H), 2.40 – 2.11 (m, 2H), 2.07 – 1.43 (m, 6H), 1.39 – 1.30 (m, 4H), 1.25 – 1.19 (m, 4H); $^{19}\text{F-NMR}$ (377 MHz, CDCl_3): δ / ppm: -61.82 (d, J = 1066.6 Hz).

5.3.30 Synthese von 5-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pentyl-4-methylbenzensulfonat (**89**)



Zu einer Lösung aus 5-(Boc-amino)-1-pentanol (**88**, 500 μL , 2.46 mmol) in DCM (5 mL) wurde NEt_3 (511.5 μL , 3.69 mmol, 1.5 eq.) zugegeben und auf 0°C gekühlt. Eine Lösung aus Tos-Cl (469.0 mg, 2.46 mmol, 1 eq.) in DCM (2 mL) wurde langsam zugetropft und die entstandene Reaktionsmischung für 2 h gerührt. Es wurde DEE (10 mL) zugegeben und die Lösung über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (cH/EA 5:1, R_f = 0.15) gereinigt. Das Produkt **89** (524.4 mg, 1.47 mmol) konnte in 60% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.34 (dd, J = 8.6, 0.7 Hz, 2H), 4.50 (s, 1 H), 4.01 (t, J = 6.4 Hz, 2 H), 3.05 (t, J = 6.8 Hz, 2 H), 2.44 (s, 3 H), 1.61-1.69 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H), 1.38-1.44 (m, 2 H), 1.29 - 1.37 (m, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 156.06, 144.79, 133.24, 129.91, 127.95, 79.28, 70.40, 40.33, 29.51, 28.57, 28.48, 22.74, 21.70.

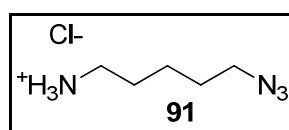
5.3.31 Synthese von *tert*-Butyl (5-azidopentyl)carbamate (**90**)



Eine Lösung aus **89** (200 mg, 0.56 mmol) und NaN_3 (91.0 mg, 1.4 mmol, 2.5 eq.) in DMF (3 mL) wurde auf 65°C erwärmt und für 6 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (20 mL) gestoppt und die entstandene Reaktionsmischung für

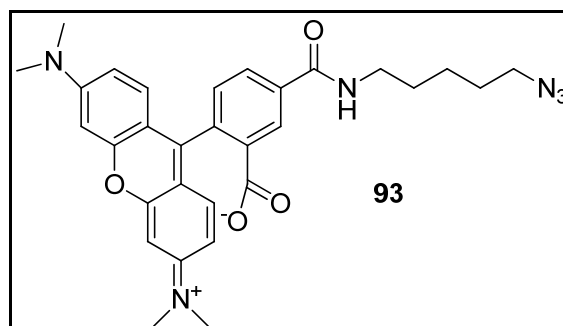
weitere 30 min gerührt. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt, Eis wurde zugegeben und dreimal mit DEE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen und dann über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Das Produkt **90** (116.5 mg, 0.51 mmol) konnte in 91% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 4.53 (s, 1 H), 3.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 3.10 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 1.56-1.64 (m, 2 H), 1.44-1.53 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H), 1.34 - 1.43 (m, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ / ppm: 156.06, 79.27, 51.39, 40.49, 29.75, 28.59, 28.48, 24.01.

5.3.32 Synthese von 5-Azidopentan-1-aminiumchlorid (**91**)



Eine Lösung aus **90** (96.2 mg, 0.42 mmol) wurde in 4 N HCl in Dioxan (2 mL) gelöst und für 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde ein N_2 -Strom für 30 min durch die Lösung geführt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum fast vollständig entfernt, wobei nicht erhitzt wurde. Die verbliebene Lösung wurde in flüssigem N_2 eingefroren und langsam im Hochvakuum aufgetaut, wobei das restliche Lösungsmittel entfernt wurde. Das Produkt **91** (53.4 mg, 0.32 mmol) konnte in 77% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 3.34 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H), 2.94 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 1.60-1.74 (m, 4 H), 1.44 - 1.52 (m, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 52.15, 40.60, 29.37, 28.12, 24.68.

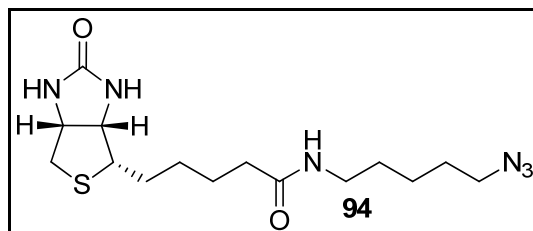
5.3.33 Synthese von Rhodamin-Azid (**93**)



Zu einer Lösung aus Rhodamin-NHS-ester (**92**, 25 mg, 0.05 mmol), DMAP (1.8 mg, 0.02 mmol, 0.3 eq.) und DIEA (43.5 μL , 0.25 mmol, 5 eq.) in DMF (1 mL) wurde eine Lösung aus **91** (11.8 mg, 0.07 mmol, 1.5 eq.) in DMF (1 mL) gegeben und die

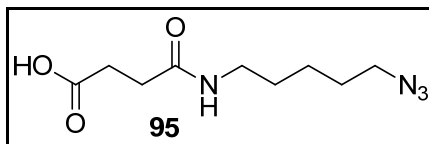
entstandene Reaktionsmischung über Nacht bei RT und unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und über eine Kieselgelsäule (DCM / MeOH zu 100% MeOH, $R_f = 0.11$) gereinigt. Das Produkt **93** (10.8 mg, 0.02 mmol) konnte in 40% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ / ppm: 8.52 (s, $\frac{1}{2}$ H), 8.14 (d, $J = 8.1$ Hz, $\frac{1}{2}$ H), 8.03 - 8.09 (m, 1 H), 7.72 (d, $J = 1.3$ Hz, $\frac{1}{2}$ H), 7.37 (d, $J = 7.9$ Hz, $\frac{1}{2}$ H), 7.24 (dd, $J = 9.5, 2.2$ Hz, 2 H), 7.01 (dt, $J = 9.5, 2.6$ Hz, 2 H), 6.90 (d, $J = 2.3$ Hz, 2 H), 3.47 (t, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 3.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 3.27 (s, 12 H), 1.40 - 1.76 (m, 8 H); LC-MS (ESI): t_R 7.42 min, m/z 541.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 540.25 berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_4$.

5.3.34 Synthese von Biotin-Azid (**94**)



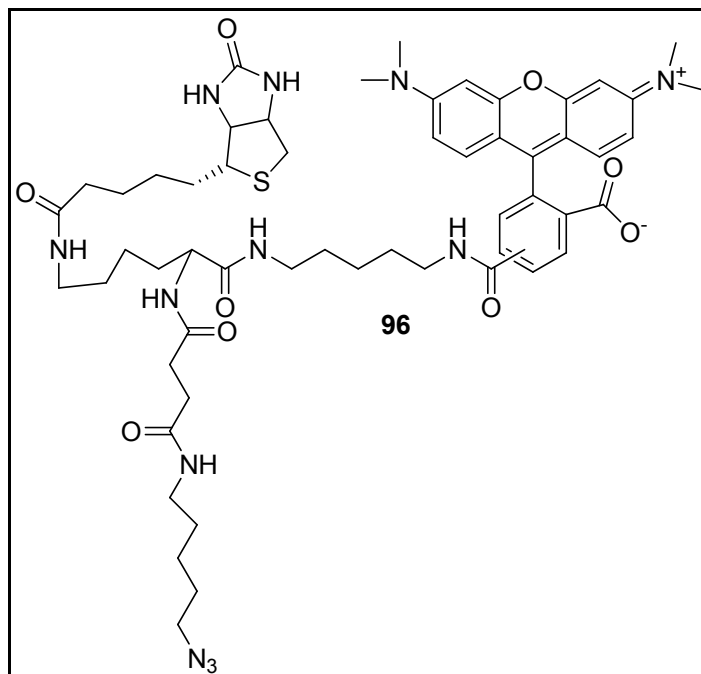
Zu einer Lösung aus Biotin (**82**, 32.6 mg, 0.13 mmol), HATU (64.3 mg, 0.17 mmol, 1.3 eq.) und DMAP (4.8 mg, 0.04 mmol, 0.3 eq.) in DMF (1 mL) wurde eine Lösung aus **91** (32.6 mg, 0.20 mmol, 1.5 eq.) und DIEA (67.9 μL , 0.39 mmol, 3 eq.) in DMF (1 mL) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 1h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM / MeOH 9:1, $R_f = 0.34$) gereinigt. Das Produkt **94** (13.4 mg, 0.04 mmol) konnte in 30% Ausbeute erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3 = 1:1$): δ / ppm: 4.47 (dd, $J = 7.8, 4.3$ Hz, 1 H), 4.28 (dd, $J = 7.9, 4.5$ Hz, 1 H), 3.25 (t, $J = 6.8$ Hz, 2 H), 3.09-3.17 (m, 1 H), 2.89 (dd, $J = 12.9, 5.0$ Hz, 1 H), 2.70 (d, $J = 12.8$ Hz, 1 H), 2.16 (td, $J = 7.2, 1.3$ Hz, 2 H), 1.36 - 1.72 (m, 14 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3 = 1:1$): δ / ppm: 175.21, 165.23, 62.87, 61.08, 56.51, 52.14, 41.12, 40.00, 36.61, 29.70, 29.32, 29.31, 29.01, 26.47, 24.88; LC-MS (ESI): t_R 6.86 min, m/z 355.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 377.07 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 354.18 berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$.

5.3.35 Synthese von 4-((5-Azidopentyl)amino)-4-oxobuttersäure (**95**)



Zu einer Lösung aus **91** (87.6 mg, 0.51 mmol) in DCM (1 mL) wurde Bernsteinsäureanhydrid (255.2 mg, 2.55 mmol, 5 eq.) und NEt₃ (353.5 µL, 2.55 mmol, 5 eq.) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 %iger NaOH-Lösung beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde einmal mit DCM extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann mit 1N HCl angesäuert und dreimal mit DCM extrahiert. Die letzterenvereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM / MeOH 19:1) gereinigt. Das Produkt **95** (93.1 mg, 0.4 mmol) konnte in 80% Ausbeute erhalten werden. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ / ppm: 3.32 – 3.28 (m, 3H), 3.18 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.67 – 1.50 (m, 4H), 1.46 – 1.07 (m, 3H).

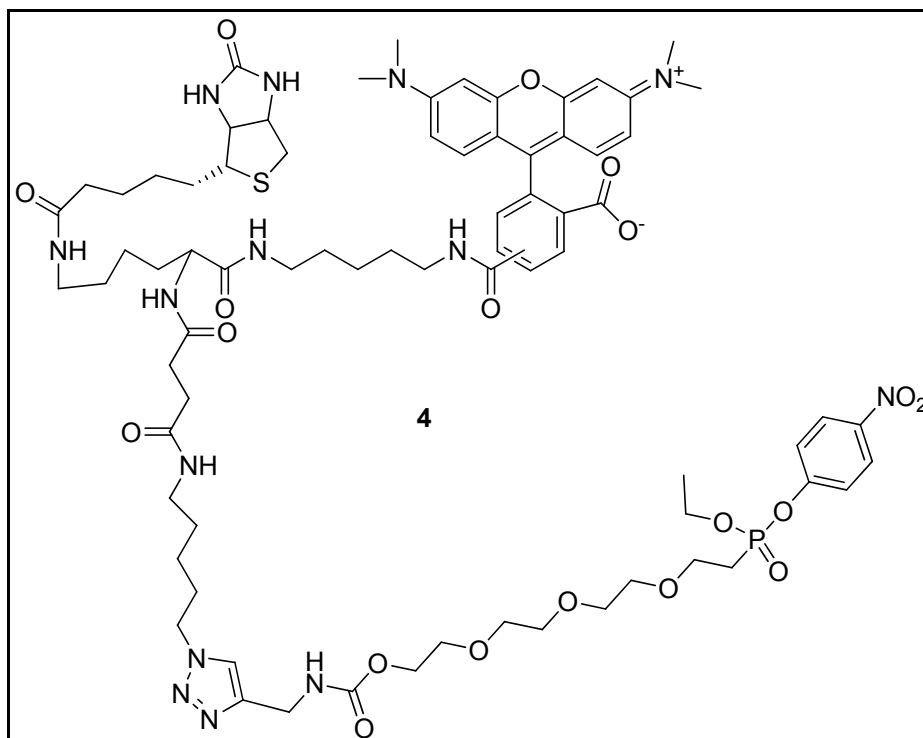
5.3.36 Synthese von Tri-Azid (**96**)



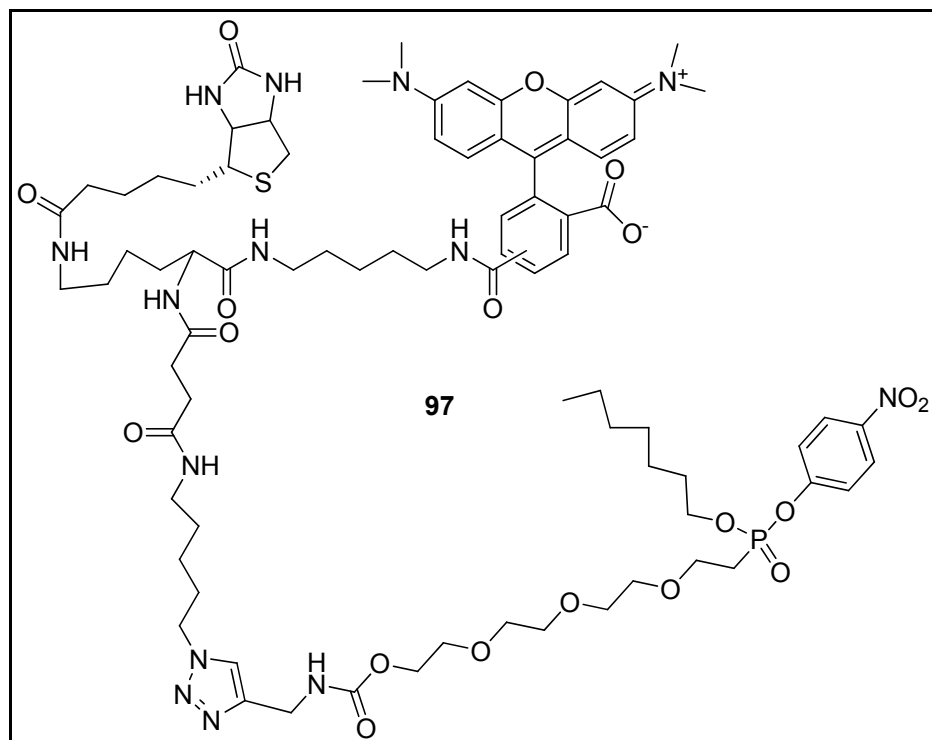
Zu einer Lösung aus Biocytin-TMR (**86**, 5 mg, 0.006mmol) und DIEA (6.2 µL, 0.032 mmol, 6 eq.) in DMF (1 mL) wurde eine Lösung aus **95** (2.1 mg, 0.009 mmol, 1.5 eq.), HATU (3.0 mg, 0.008 mmol, 1.3 eq.) und DMAP (0.2 mg, 0.001 mmol, 0.3 eq.) in DMF (1 mL) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde

anschließend im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine RP-C18-Kieselgelsäule (H₂O, AcN 40%) gereinigt. Das Produkt **96** (5.2 mg, 0.005 mmol) konnte in 80% Ausbeute erhalten werden. LC-MS (ESI): t_R 6.85 min, m/z 1079.47 $[M+H]^+$, 10798.54 berechnet für C₅₅H₇₄N₁₂O₉S.

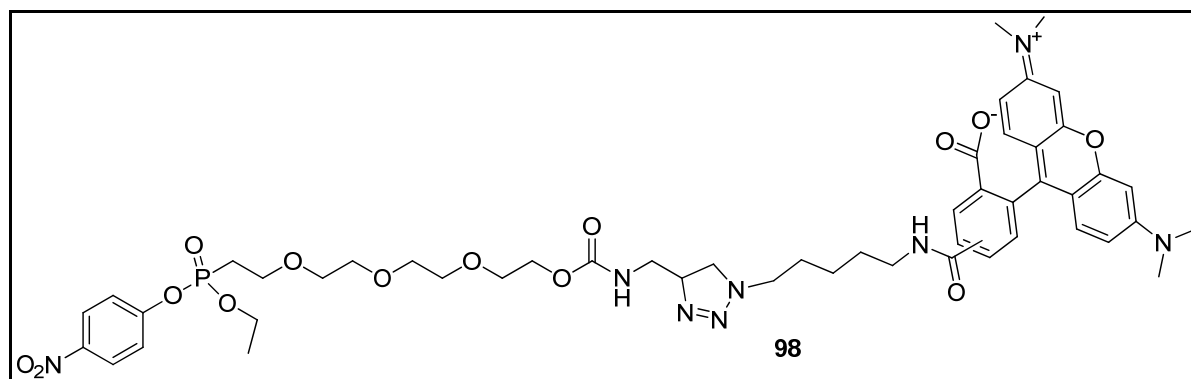
5.3.41 Synthese von Tri-NP (4)



Es wurde zur Reaktionsführung die generelle Methode F mit einer Ansatzgröße von 0.9 μ mol verwendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das eine C18-Kieselgelsäule (H₂O, 40% AcN) durchgeführt. Das Produkt **4** (0,4 mg, 0.26 μ mol) konnte in 29% Ausbeute erhalten werden. LC-MS(ESI): t_R 7.48 min, m/z 1567.60 $[M+H]^+$, 1589.53 $[M+Na]^+$, 784.80 $[M+2H]^{2+}$, 1566.70 berechnet für C₇₅H₁₀₃N₁₄O₁₉PS.

5.3.42 Synthese von Tri-NP-C7 (97)

Es kam die generelle Methode F mit einer Ansatzgröße von 0.9 μmol zum Einsatz. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine RP-C18-Kieselgelsäule (H_2O , 50% AcN) aufgereinigt. Das Produkt **97** (0.23 mg, 0.14 μmol) konnte in 16% Ausbeute erhalten werden. LC-MS (ESI): t_R 8.21 min, m/z 1636.33 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1636.78 berechnet für $\text{C}_{80}\text{H}_{113}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{PS}$.

5.3.43 Synthese von Rhodamin-NP (98)

Die Reaktion wurde mit einem 1.8 μmol -Ansatz nach der generellen Methode F durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine RP-C18-Kieselgelsäule (H_2O , 35% AcN) aufgereinigt. Das Produkt **98** (0.42 mg,

0.4 μmol) konnte in 23% Ausbeute erhalten werden. LC-MS (ESI): t_R 7.80 min, m/z 1029.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1051.40 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1028.40 berechnet für $\text{C}_{50}\text{H}_{63}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{P}$.

5.4 Biologische Experimente

5.4.1 Inkubation der Zellkultur

Für die *in vivo* Experimente wurde 6 Tage alte *Arabidopsis thaliana*-Zellkultur verwendet. Die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit frischem Medium gewaschen. in frischem Medium aufgenommen und aliquotiert. Anschließend wurden die Sonden nach einem festgelegten Pipetierschema zugegeben. Als Negativkontrolle wurde DMSO verwendet. Es wurde für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit frischem Medium gewaschen und in 1.5 mL Eppendorfgefäße überführt. Das Medium wurde vollständig entfernt und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C eingelagert.

5.4.2 Reaktionsdetails für den Naturstoff Callysponginsäure (1)

Es wurden insgesamt 40 mL Zellkultur entnommen, die in 8 Portionen á 5 mL in die Wellplates überführt wurden. Der Hälfte der Proben wurde der Naturstoff **1** (5 μL , 10 mM in DMSO) zugegeben und der anderen Hälfte das gleiche Volumen an DMSO, so dass die Reaktion bei einer Konzentration von 10 μM stattgefunden hat. Nach den zwei Stunden Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und gewaschen.

5.4.3 Reaktionsdetails zum Experiment mit den Phosphonatsonden

Es wurde 20 mL Zellkultur verwendet, die in 40 Portionen zu 300 μL in die Wellplates aliquotiert wurden. Die Reaktion wurde bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt und jede Konzentration wurde einmal wiederholt, so dass am Ende zwei Sätze jeder Konzentration vorlagen. Es wurden folgende Phosphonatproben verwendet: FP-PEG **2**, Pivalat **80**, Nitrophenol-Phthalimid **79**, *p*-Nitrophenol **3**, *p*-Nitrophenol-OH **81**, P-OH **65**, FP-C7 **73**, *p*-Nitrophenol-C7 **71** und FP-Alkan als Vergleich. Es wurden die Konzentrationen von 2 μM und 10 μM verwendet. Die Zellen wurden mit den Sonden (6 μL bzw. 30 μL , 1mM in DMSO) inkubiert, auch hier wurde die gleiche Menge an DMSO als Negativkontrolle verwendet. Beim 10 μM

Ansatz konnte beobachtet werden, dass nach der Überführung wenig Zellmaterial vorhanden war, was auf die Menge an DMSO zurückzuführen ist, welche auf die Zellen toxisch wirkte.

Literatur

- [1] D. A. Jeffery, M. Bogoy, Curr. Opin. Biotechnol. **2003**, 14(1), 87-95.
- [2] H. Overkleeft, Bioorg. Med. Chem. **2012**, 20(2), 552-553.
- [3] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. B. Anfinsen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1968**, 61(2), 636-643.
- [4] R. Aebersold, M. Mann, Nature **2003**, 422(6928), 198-207.
- [5] M. Wilm, M. Mann, Anal. Chem. **1996**, 68(1), 1-8.
- [6] S. Bach, M. Knockaert, J. Reinhardt, O. Lozach, S. Schmitt, B. Baratte, M. Koken, S. P. Coburn, L. Tang, T. Jiang, *et al.*, J. Biol. Chem. **2005**, 280(35), 31208-31219.
- [7] D. Brehmer, K. Godl, B. Zech, J. Wissing, H. Daub, Mol. Cell. Proteomics **2004**, 3(5), 490-500.
- [8] U. Rix, G. Superti-Furga, Nat. Chem. Biol. **2009**, 5(9), 616-624.
- [9] L. Faleiro, R. Kobayashi, H. Fearnhead, Y. Lazebnik, EMBO J. **1997**, 16(9), 2271-2281.
- [10] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradszky, M. Bogoy, Mol. Cell. Proteomics **2002**, 1(1), 60-68.
- [11] D. Greenbaum, K. F. Medzihradszky, A. Burlingame, M. Bogoy, Chem. Biol. **2000**, 7(8), 569-581.
- [12] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, Biochemistry **2001**, 40(13), 4005-4015.
- [13] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1999**, 96(26), 14694-14699.
- [14] M. Uttamchandani, J. Li, H. Sun, S. Q. Yao, Chem. Bio. Chem. **2008**, 9(5), 667-675.
- [15] S. Verhelst, M. Bogoy, Biotechniques **2005**, 38(2), 175-177.
- [16] M. Bogoy, S. Verhelst, V. Bellingard-Dubouchaud, S. Toba, D. Greenbaum, Chem. Biol. **2000**, 7(1), 27-38.
- [17] Y.-M. Li, M. Xu, M.-T. Lai, Q. Huang, J. L. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J. G. Neduvellil, *et al.*, Nature **2000**, 405(6787), 689-694.
- [18] M. P. Patricelli, D. K. Jiang, L. M. Stamp, J. J. Burbaum, Proteomics **2001**, 1(9), 1067-1071.
- [19] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E.-J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2003**, 100(16), 9116-9121.

- [20] M. P. Patricelli, A. K. Szardenings, M. Liyanage, T. K. Nomanbhoy, M. Wu, H. Weissig, A. Aban, D. Chun, S. Tanner, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **2006**, *46*(2), 350-358.
- [21] L.-C. Lo, T.-L. Pang, C.-H. Kuo, Y.-L. Chiang, H.-Y. Wang, J.-J. Lin, *J. Proteome Res.* **2002**, *1*(1), 35-40.
- [22] J. C. Powers, J. L. Asgian, Ö. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*(12), 4639-4750.
- [23] D. C. Greenbaum, W. D. Arnold, F. Lu, L. Hayrapetian, A. Baruch, J. Krumrine, S. Toba, K. Chehade, D. Brömme, I. D. Kuntz, *et al.*, *Chem. Biol.* **2002**, *9*(10), 1085-1094.
- [24] C. Therrien, R. C. Levesque, *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*(3), 251-262.
- [25] J. R. Betley, S. Cesaro-Tadic, A. Mekhalfia, J. H. Rickard, H. Denham, L. J. Partridge, A. Plückthun, G. M. Blackburn, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41*(5), 775-777.
- [26] Q. P. Wang, U. Dechert, F. Jirik, S. G. Withers, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1994**, *200*(1), 577-583.
- [27] K. D. Janda, L.-C. Lo, C.-H. L. Lo, M.-M. Sim, R. Wang, C.-H. Wong, R. A. Lerner, *Science* **1997**, *275*(5302), 945-948.
- [28] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotech.* **1999**, *17*(10), 994-999.
- [29] E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon, F. Richter, S. Khare, M. B. D. Dillon, D. A. Bachovchin, K. Mowen, D. Baker, B. F. Cravatt, *Nature* **2010**, *468*(7325), 790-795.
- [30] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*(4), 535-546.
- [31] D. J. Hnatowich, F. Virzi, M. Rusckowski, *J. Nuc. Med.* **1987**, *28*(8), 1294-1302.
- [32] H. Zhou, J. A. Ranish, J. D. Watts, R. Aebersold, *Nat. Biotech.* **2002**, *20*(5), 512-515.
- [33] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*(1), 635-646.
- [34] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*(24), 1128-1137.
- [35] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*(1), 383-414.
- [36] N. Jessani, S. Niessen, B. Q. Wei, M. Nicolau, M. Humphrey, Y. Ji, W. Han, D.-Y. Noh, J. R. Yates, S. S. Jeffrey, *et al.*, *Nat. Meth.* **2005**, *2*(9), 691-697.
- [37] J. P. Alexander, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(30), 9699-9704.

-
- [38] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.***2006**, 2(5), 274-281.
- [39] G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.***2004**, 126(5), 1363-1368.
- [40] E. S. Okerberg, J. Wu, B. Zhang, B. Samii, K. Blackford, D. T. Winn, K. R. Shreder, J. J. Burbaum, M. P. Patricelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2005**, 102(14), 4996-5001.
- [41] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.***2005**, 127(28), 10018-10019.
- [42] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.***2003**, 125(16), 4686-4687.
- [43] N. Jessani, M. Humphrey, W. H. McDonald, S. Niessen, K. Masuda, B. Gangadharan, J. R. Yates, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2004**, 101(38), 13756-13761.
- [44] D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotech.***2003**, 21(6), 687-691.
- [45] J. P. Alexander, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.***2005**, 12(11), 1179-1187.
- [46] J. A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F.-Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogoy, D. Hanahan, *Cancer Cell***2004**, 5(5), 443-453.
- [47] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat. Meth.***2007**, 4(10), 822-827.
- [48] A. B. Berger, P. M. Vitorino, M. Bogoy, *Am. J. Pharmacogenomics***2004**, 4(6), 371-381.
- [49] M. Fonovic, M. Bogoy, *Curr. Pharm. Design***2007**, 13(3), 253-261.
- [50] E. W. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.***2004**, 126(44), 14435-14446.
- [51] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2004**, 101(27), 10000-10005.
- [52] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, *et al.*, *Nature***2001**, 409(6822), 860-921.
- [53] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, *et al.*, *Science***2001**, 291(5507), 1304-1351.
- [54] R. F. Colman, *Annu. Rev. Biochem.***1983**, 52(1), 67-91.

- [55] S. Kumar, B. Zhou, F. Liang, W.-Q. Wang, Z. Huang, Z.-Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*(21), 7943-7948.
- [56] Q. Zhu, X. Huang, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*(13), 2669-2672.
- [57] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*(suppl 1), D227-D233.
- [58] G. M. Rubin, M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. Gabor, Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, P. W. Li, R. Apweiler, *et al.*, *Science* **2000**, *287*(5461), 2204-2215.
- [59] R. M. Kini, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2005**, *34*(4-5), 200-204.
- [60] M. J. Smyth, M. D. O'Connor, J. A. Trapani, *J. Leukocyte Biol.* **1996**, *60*(5), 555-562.
- [61] J. V. Bonventre, Z. Huang, M. R. Taheri, E. O'Leary, E. Li, M. A. Moskowitz, A. Sapirstein, *Nature* **1997**, *390*(6660), 622-625.
- [62] H. S. Hoover, J. L. Blankman, S. Niessen, B. F. Cravatt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*(22), 5838-5841.
- [63] B. F. Cravatt, D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner, N. B. Gilula, *Nature* **1996**, *384*(6604), 83-87.
- [64] P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*(7), 4025-4028.
- [65] D. F. Steiner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*(1), 31-39.
- [66] M. E. Lowe, *J. Nutr.* **1997**, *127*(4), 549-557.
- [67] Y. Ikeda, K.-i. Aihara, S. Yoshida, T. Iwase, S. Tajima, Y. Izawa-Ishizawa, Y. Kihira, K. Ishizawa, S. Tomita, K. Tsuchiya, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*(41), 34256-34263.
- [68] K. P. Chiang, S. Niessen, A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2006**, *13*(10), 1041-1050.
- [69] G. J. Kato, *Hum. Mutat.* **1999**, *13*(2), 87-98.
- [70] H. Steuber, R. Hilgenfeld, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*(3), 323-345.
- [71] C. Damblon, X. Raquet, L. Y. Lian, J. Lamotte-Brasseur, E. Fonce, P. Charlier, G. C. Roberts, J. M. Frère, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*(5), 1747-1752.
- [72] M. J. White, J. P. Savaryn, D. J. Bretl, H. He, R. M. Penoske, S. S. Terhune, T. C. Zahrt, *PLoS ONE* **2011**, *6*(3), e18175.
- [73] S. Hennessy, C. M. Perry, *Drugs* **2006**, *66*(12), 1625-1656.
- [74] N. A. Thornberry, A. E. Weber, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*(6), 557-568.

-
- [75] A. F. Kluge, R. C. Petter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*(3), 421-427.
- [76] M. Racchi, M. Mazzucchelli, E. Porrello, C. Lanni, S. Govoni, *Pharmacol. Res.* **2004**, *50*(4), 441-451.
- [77] P. Bar-On, C. B. Millard, M. Harel, H. Dvir, A. Enz, J. L. Sussman, I. Silman, *Biochemistry* **2002**, *41*(11), 3555-3564.
- [78] W. G. Eisert, N. Hael, J. Stangier, W. Wienen, A. Clemens, J. van Ryn, *Arterioscl. Throm. Vas.* **2010**, *30*(10), 1885-1889.
- [79] N. H. Hael, H. Nar, H. Priepke, U. Ries, J.-M. Stassen, W. Wienen, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*(9), 1757-1766.
- [80] D. Kim, L. Wang, M. Beconi, G. J. Eiermann, M. H. Fisher, H. He, G. J. Hickey, J. E. Kowalchick, B. Leiting, K. Lyons, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*(1), 141-151.
- [81] E. Perzborn, S. Roehrig, A. Straub, D. Kubitz, F. Misselwitz, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*(1), 61-75.
- [82] S. Roehrig, A. Straub, J. Pohlmann, T. Lampe, J. Pernerstorfer, K.-H. Schlemmer, P. Reinemer, E. Perzborn, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*(19), 5900-5908.
- [83] E. Böttcher, T. Matrosovich, M. Beyerle, H.-D. Klenk, W. Garten, M. Matrosovich, *J. Virol.* **2006**, *80*(19), 9896-9898.
- [84] M. Holmquist, *Curr. Prot. Pept. Sci.* **2000**, *1*(2), 209-235.
- [85] G. M. Simon, B. F. Cravatt, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*(15), 11051-11055.
- [86] M. Shahiduzzaman, K. M. Coombs, *Front. Microbiol.* **2012**, *3*(
- [87] B. Domon, R. Aebersold, *Science* **2006**, *312*(5771), 212-217.
- [88] S. D. Patterson, R. H. Aebersold, *Nat. Genet.* **2003**, *33*(311-323).
- [89] J. R. Yates, *Annu. Rev. Bioph. Biom.* **2004**, *33*(1), 297-316.
- [90] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*(8), 3279-3301.
- [91] D. A. Bachovchin, B. F. Cravatt, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*(1), 52-68.
- [92] N. Jessani, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*(1), 54-59.
- [93] N. Jessani, Y. Liu, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*(16), 10335-10340.
- [94] S. Mahrus, C. S. Craik, *Chem. Biol.* **2005**, *12*(5), 567-577.
- [95] Z. Pan, D. A. Jeffery, K. Chehade, J. Beltman, J. M. Clark, P. Grothaus, M. Bogoy, A. Baruch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*(11), 2882-2885.

- [96] K. Ahn, D. S. Johnson, L. R. Fitzgerald, M. Liimatta, A. Arendse, T. Stevenson, E. T. Lund, R. A. Nugent, T. K. Nomanbhoy, J. P. Alexander, *et al.*, *Biochemistry***2007**, *46*(45), 13019-13030.
- [97] M. K. McKinney, B. F. Cravatt, *Annu. Rev. Biochem.***2005**, *74*(1), 411-432.
- [98] J. Z. Long, D. K. Nomura, R. E. Vann, D. M. Walentiny, L. Booker, X. Jin, J. J. Burston, L. J. Sim-Selley, A. H. Lichtman, J. L. Wiley, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2009**, *106*(48), 20270-20275.
- [99] D. A. Bachovchin, T. Ji, W. Li, G. M. Simon, J. L. Blankman, A. Adibekian, H. Hoover, S. Niessen, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2010**, *107*(49), 20941-20946.
- [100] W. Li, J. L. Blankman, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.***2007**, *129*(31), 9594-9595.
- [101] A. Adibekian, B. R. Martin, C. Wang, K.-L. Hsu, D. A. Bachovchin, S. Niessen, H. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.***2011**, *7*(7), 469-478.
- [102] D. G. Tew, H. F. Boyd, S. Ashman, C. Theobald, C. A. Leach, *Biochemistry***1998**, *37*(28), 10087-10093.
- [103] M. C. Gershater, R. Edwards, *Plant Sci.***2007**, *173*(6), 579-588.
- [104] P. Taylor, Z. Radic, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.***1994**, *34*(1), 281-320.
- [105] R. G. Vogt, L. M. Riddiford, G. D. Prestwich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***1985**, *82*(24), 8827-8831.
- [106] T. Satoh, M. Hosokawa, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.***1998**, *38*(1), 257-288.
- [107] J. M. Turner, N. A. Larsen, A. Basran, C. F. Barbas, N. C. Bruce, I. A. Wilson, R. A. Lerner, *Biochemistry***2002**, *41*(41), 12297-12307.
- [108] P. Heikinheimo, A. Goldman, C. Jeffries, D. L. Ollis, *Structure***1999**, *7*(6), R141-R146.
- [109] M. Nardini, B. W. Dijkstra, *Curr. Opin. Struct. Biol.***1999**, *9*(6), 732-737.
- [110] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolo, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, *et al.*, *Protein Eng.***1992**, *5*(3), 197-211.
- [111] J. G. Oakeshott, C. Claudianos, R. J. Russell, G. C. Robin, *BioEssays***1999**, *21*(12), 1031-1042.
- [112] N. R. Ileperuma, S. D. G. Marshall, C. J. Squire, H. M. Baker, J. G. Oakeshott, R. J. Russell, K. M. Plummer, R. D. Newcomb, E. N. Baker, *Biochemistry***2007**, *46*(7), 1851-1859.
- [113] W. N. Aldridge, *Biochem. J.* **1953**, *53*(1), 110-117.

-
- [114] F. Bergmann, R. Segal, S. Rimon, *Biochem. J.* **1957**, 67(3), 481-486.
 - [115] D. Kumar, D. F. Klessig, *Prod. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100(26), 16101-16106.
 - [116] B. Jeffcoat, W. N. Harries, *Pestic. Sci.* **1975**, 6(3), 283-296.
 - [117] J. P. Ruiz-Santaella, A. Heredia, R. Prado, *Planta* **2006**, 223(2), 191-199.
 - [118] D. Pontier, L. Godiard, Y. Marco, D. Roby, *Plant J.* **1994**, 5(4), 507-521.
 - [119] D. Pontier, M. Tronchet, P. Rogowsky, E. Lam, D. Roby, *Mol. Plant Microbe In.* **1998**, 11(6), 544-554.
 - [120] M. Tronchet, B. Ranty, Y. Marco, D. Roby, *Plant J.* **2001**, 27(2), 115-127.
 - [121] A. R. Walden, C. Walter, R. C. Gardner, *Plant Physiol.* **1999**, 121(4), 1103-1116.
 - [122] C. R. Woese, G. E. Fox, *J. Mol. Evol.* **1977**, 10(1), 1-6.
 - [123] T. Allers, M. Mevarech, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6(1), 58-73.
 - [124] A. Boetius, K. Ravenschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B. B. Jorgensen, U. Witte, O. Pfannkuche, *Nature* **2000**, 407(6804), 623-626.
 - [125] S. J. Hallam, N. Putnam, C. M. Preston, J. C. Detter, D. Rokhsar, P. M. Richardson, E. F. DeLong, *Science* **2004**, 305(5689), 1457-1462.
 - [126] V. J. Orphan, C. H. House, K.-U. Hinrichs, K. D. McKeegan, E. F. DeLong, *Science* **2001**, 293(5529), 484-487.
 - [127] D. Valentine, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2002**, 81(1-4), 271-282.
 - [128] A. Oren, *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, 13(4), 415-439.
 - [129] A. Oren, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2002**, 39(1), 1-7.
 - [130] F. Rodriguez-Valera, F. Ruiz-Berraquero, A. Ramos-Cormenzana, *Can. J. Microbiol.* **1980**, 26(11), 1259-1263.
 - [131] K. Kashefi, D. R. Lovley, *Science* **2003**, 301(5635), 934.
 - [132] J. L. C. M. van de Vossenberg, A. J. M. Driessen, W. N. Konings, *Extremophiles* **1998**, 2(3), 163-170.
 - [133] J. L. C. M. Van De Vossenberg, T. Ubbink-Kok, M. G. L. Elferink, A. J. M. Driessen, W. N. Konings, *Mol. Microbiol.* **1995**, 18(5), 925-932.
 - [134] P. L. Bond, G. K. Druschel, J. F. Banfield, *Appl. Environ. Microb.* **2000**, 66(11), 4962-4971.
 - [135] D. B. Johnson, B. Stallwood, S. Kimura, K. B. Hallberg, *Arch. Microbiol.* **2006**, 185(3), 212-221.
 - [136] P. L. Siering, J. M. Clarke, M. S. Wilson, *Geomicrobiol. J.* **2006**, 23(2), 129-141.

-
- [137] C. A. Francis, K. J. Roberts, J. M. Beman, A. E. Santoro, B. B. Oakley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*(41), 14683-14688.
- [138] S. Leininger, T. Urich, M. Schlöter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, C. Schleper, *Nature* **2006**, *442*(7104), 806-809.
- [139] C. Wuchter, B. Abbas, M. J. L. Coolen, L. Herfort, J. van Bleijswijk, P. Timmers, M. Strous, E. Teira, G. J. Herndl, J. J. Middelburg, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*(33), 12317-12322.
- [140] R. K. Thauer, *Microbiology* **1998**, *144*(9), 2377-2406.
- [141] A. A. Raghoebarsing, A. Pol, K. T. van de Pas-Schoonen, A. J. P. Smolders, K. F. Ettwig, W. I. C. Rijpstra, S. Schouten, J. S. S. Damste, H. J. M. Op den Camp, M. S. M. Jetten, *et al.*, *Nature* **2006**, *440*(7086), 918-921.
- [142] E. F. DeLong, N. R. Pace, *Syst. Biol.* **2001**, *50*(4), 470-478.
- [143] J. W.-H. Li, J. C. Vederas, *Science* **2009**, *325*(5937), 161-165.
- [144] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*(7), 1022-1037.
- [145] C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, *44*(36), 5788-5809.
- [146] E. E. Carlson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*(7), 639-653.
- [147] F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*(3), 206-220.
- [148] M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*(48), 17272-17277.
- [149] J. Clardy, C. Walsh, *Nature* **2004**, *432*(7019), 829-837.
- [150] K.-W. Cheng, C.-C. Wong, M. Wang, Q.-Y. He, F. Chen, *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*(1), 126-155.
- [151] G. C. Terstappen, C. Schlupen, R. Raggiaschi, G. Gaviraghi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*(11), 891-903.
- [152] M. L. Bourguet-Kondracki, M. T. Rakotoarisoa, M. T. Martin, M. Guyot, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*(2), 225-226.
- [153] J.-R. Dai, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina, G. N. Gray, M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*(9), 860-865.
- [154] X. Fu, S. A. Abbas, F. J. Schmitz, I. Vidavsky, M. L. Gross, M. Laney, R. C. Schatzman, R. D. Cabuslay, *Tetrahedron* **1997**, *53*(3), 799-814.
- [155] X. Fu, F. J. Schmitz, M. Kelly, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*(9), 1336-1338.

- [156] N. Fusetani, T. Shiragaki, S. Matsunaga, K. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28(37), 4313-4314.
- [157] A. Guerriero, C. Debitus, D. Laurent, M. D'Ambrosio, F. Pietra, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39(35), 6395-6398.
- [158] T. Ichiba, P. J. Scheuer, M. Kelly-Borges, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76(8), 2814-2816.
- [159] S. Isaacs, Y. Kashman, S. Loya, A. Hizi, Y. Loya, *Tetrahedron* **1993**, 49(45), 10435-10438.
- [160] M. Kobayashi, T. Mahmud, H. Tajima, W. Wang, S. Aoki, S. Nakagawa, T. Mayumi, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44(4), 720-724.
- [161] H.-Y. Li, S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Prod. Nat.* **1994**, 57(10), 1464-1467.
- [162] E. Quiñoà, P. Crews, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29(17), 2037-2040.
- [163] Y. Nakao, T. Uehara, S. Matunaga, N. Fusetani, R. W. M. van Soest, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65(6), 922-924.
- [164] S. Tsukamoto, H. Kato, H. Hirota, N. Fusetani, *J. Nat. Prod.* **1997**, 60(2), 126-130.
- [165] M. Uno, S. Ohta, E. Ohta, S. Ikegami, *J. Nat. Prod.* **1996**, 59(12), 1146-1148.
- [166] H. C. Hang, E.-J. Geutjes, G. Grotenbreg, A. M. Pollington, M. J. Bijlmakers, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129(10), 2744-2745.
- [167] R. N. Hannoush, N. Arenas-Ramirez, *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4(7), 581-587.
- [168] F. Kaschani, C. Gu, S. Niessen, H. Hoover, B. F. Cravatt, R. A. L. van der Hoorn, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8(5), 1082-1093.
- [169] B. M. Trost, A. H. Weiss, A. Jacobi von Wangelin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 128(1), 8-9.
- [170] M. Miyashita, A. Yoshikoshi, P. A. Grieco, *J. Org. Chem.* **1977**, 42(23), 3772-3774.
- [171] H. A. Bates, J. Farina, M. Tong, *J. Org. Chem.* **1986**, 51(14), 2637-2641.
- [172] J. M. Chong, M. A. Heuft, P. Rabbat, *J. Org. Chem.* **2000**, 65(18), 5837-5838.
- [173] S. Müller, R. R. Schmidt, *J. Prakt. Chem.* **2000**, 342(8), 779-784.
- [174] H. Guo, G. A. O'Doherty, *Org. Lett.* **2005**, 7(18), 3921-3924.
- [175] B. A. Kulkarni, A. Chattopadhyay, V. R. Mamdapur, *J. Nat. Prod.* **1994**, 57(4), 537-538.
- [176] J.-L. Abad, F. Camps, G. Fabriàs, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129(48), 15007-15012.
- [177] H.-T. Chang, M. Jeganmohan, C.-H. Cheng, *Org. Lett.* **2007**, 9(3), 505-508.

- [178] M. Schelper, O. Buisine, S. Kozhushkov, C. Aubert, A. de Meijere, M. Malacria, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005(14), 3000-3007.
- [179] F. Slowinski, C. Aubert, M. Malacria, *J. Org. Chem.* **2002**, 68(2), 378-386.
- [180] M. J. Cryle, N. J. Matovic, J. J. De Voss, *Org. Lett.* **2003**, 5(18), 3341-3344.
- [181] O. Kukovinets, A. Kukovinets, V. Kasradze, E. Salimova, M. Abdullin, *Russ. J. Org. Chem.* **2010**, 46(6), 798-806.
- [182] E. M. Santangelo, A. G. Corrêa, P. H. G. Zarbin, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(29), 5135-5137.
- [183] E. Fillion, V. E. Trépanier, L. G. Mercier, A. A. Remorova, R. J. Carson, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(7), 1091-1094.
- [184] S. E. Denmark, S.-M. Yang, *Tetrahedron* **2004**, 60(43), 9695-9708.
- [185] A. F. Petri, S. M. Kühnert, F. Scheufler, M. E. Maier, *Synthesis* **2003**, 2003(06), 0940-0955.
- [186] J. S. Yadav, N. Thrimurtulu, K. Uma Gayathri, B. V. Subba Reddy, A. R. Prasad, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49(47), 6617-6620.
- [187] J. Marco-Contelles, E. de Opazo, *J. Org. Chem.* **2002**, 67(11), 3705-3717.
- [188] A. Fürstner, C. Nevado, M. Waser, M. Tremblay, C. Chevrier, F. Teplý, C. Aïssa, E. Moulin, O. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129(29), 9150-9161.
- [189] R. Munakata, H. Katakai, T. Ueki, J. Kurosaka, K.-i. Takao, K.-i. Tadano, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(36), 11254-11267.
- [190] T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nat. Protocols* **2007**, 2(10), 2451-2458.
- [191] M. Alami, F. Ferri, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(16), 2763-2766.
- [192] G. Zheng, W. Lu, J. Cai, *J. Nat. Prod.* **1999**, 62(4), 626-628.
- [193] J. Wityak, J. B. Chan, *Synthetic Commun.* **1991**, 21(8-9), 977-979.
- [194] D. L. Boger, J. A. McKie, T. Nishi, T. Ogiku, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(9), 2301-2302.
- [195] L. D. Jennings, D. R. Rayner, D. B. Jordan, J. F. Okonya, G. S. Basarab, D. K. Amorose, B. M. Anaclerio, J. K. Lee, R. S. Schwartz, K. A. Whitmore, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 8(5), 897-907.
- [196] P. Kuhenne, Diplomarbeit, TU Dortmund **2007**.
- [197] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1(10), 828-835.
- [198] E. Ghanem, Y. Li, C. Xu, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2007**, 46(31), 9032-9040.
- [199] H. P. Dijkstra, H. Sprong, B. N. H. Aerts, C. A. Kruithof, M. R. Egmond, R. J. M. Klein Gebbink, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6(3), 523-531.

- [200] R. Ortmann, J. Wiesner, A. Reichenberg, D. Henschker, E. Beck, H. Jomaa, M. Schlitzer, Arch. Pharm. **2005**, 338(7), 305-314.
- [201] Xuezhong, CN 1375495, **2002**.
- [202] J. Clerc, Dissertation, TU Dortmund **2010**.
- [203] L. Gur'eva, U. Budanova, Y. Sebyakin, Russ. J. Org. Chem. **2009**, 45(2), 173-177.
- [204] S. Nickel, F. Kaschani, T. Colby, R. A. L. van der Hoorn, M. Kaiser, Bioorg. Med. Chem. **2012**, 20(2), 601-606.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Kaiser, der es mir ermöglicht hat, diese Dissertation unter seiner Betreuung durchzuführen und für das interessante Thema, welches ich selbstständig bearbeiten durfte. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellungen, wenn mir die Ideen ausgegangen sind.

Ich möchte mich bei Dr. Farnusch Kaschani bedanken, der die meisten der biologischen Experimente durchgeführt hat und mir bei meinen eigenen biologischen Experimenten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich bei allen meinen Kollegen bedanken:

Bei Dr. Sara Christina Stolze, für die tolle Zusammenarbeit unter einem Abzug und die vielen Hilfestellungen.

Bei Timon Mönig, für die tollen Diskussionen rund um die Chemie und den Alltag.

Bei Daniel Krahn, für die lustigen Mittagspausen am Freitag, bei denen nicht nur private Dinge ausführlich diskutiert wurden.

Bei Julian Oeljeklaus, für die gute Laune im Labor und die lustigen Sprüche.

Bei Yvonne Blass und Marija Mamic, für die lustigen Diskussionen.

Bei Svenja Kernchen, die für jegliche verwaltungstechnische Fragen mir immer zur Seite stand und die netten Unterhaltungen zwischendurch.

Allen meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen, für die nette und abwechslungsreiche Atmosphäre im Labor.

Bei Dr. Renier van der Hoorn und seiner Arbeitsgruppe für die tollen Seminare und die Hilfestellungen bei meinen biologischen Experimenten.

Allen Mitgliedern im Chemical Genomics Centre des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie und den Mitarbeitern der AG Ehrmann des Zentrums für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen für ihre Unterstützung und ein angenehmes arbeiten.

Mein größter Dank gilt meinem Mann, Dipl. Chem. Philipp Nickel, geb. Kuhenne, der mich beruflich und auch privat immer unterstützt und aufgebaut hat, wenn es mal wieder nicht so lief, wie es sollte. Ich liebe dich!

Ebenfalls mein größter Dank geht an meine Eltern und meinem Bruder, die immer an mich geglaubt haben und mich immer in meinen Entscheidungen unterstützt haben.

Vielen Dank auch an meine besten Freunde und meine gesamte Familie.

Lebenslauf Sabrina Nickel

Persönliche Daten

Geburtsdatum und –ort: 10.10.1982 in Datteln

Eltern: Ralf Nickel, Ausbilder bei der TÜV-Nord
Barbara Nickel, Kauffrau für Bürokommunikation

Geschwister: Martin Nickel

Familienstand: verheiratet

Ausbildung

Seit 06/2011 Promotion in Biologie an der Universität Duisburg-Essen, Zentrum für Medizinische Biotechnologie

11/2007 – 06/2011 Promotion in Chemie an der TU Dortmund, Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft

AG Prof. Dr. M. Kaiser

Betreuer: Prof. Dr. M. Kaiser

Dissertation: Chemische Synthese des Polyacetylen-Naturstoffes Callyspongynsäure und neuartiger, Phosphat-basierter aktivitätsbaierter Sonden

05/2007 – 10/2007 Diplomarbeit, TU Dortmund, Chemical Genomics Center der Max-,Planck-Gesellschaft

AG Dr. M. Kaiser

Betreuer: Prof. Dr. H. Waldmann

Diplomarbeit: Synthese von HtrA-Protease Aktivatoren

10/2002 – 04/2007	Diplomstudium der Chemie, TU Dortmund
08/1993 – 07/2002	Comenius-Gymnasium, Datteln
08/1989 – 07/1993	Gustav-Adolf-Grundschule, Datteln

Wissenschaftliche Arbeit

Seit 04/2007	Chemische Synthese am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft und am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen
04/2009 und 08/2009	Forschungsaufenthalte im Plant Chemetics Labor, Dr. R. van der Hoorn, MPI für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln
04/2006 – 06/2006	Praktikum in bio-anorganischer Chemie, AG Dr. J. Müller, TU Dortmund
12/2006 – 02/2007	Praktikum in bio-organischer Chemie, AG Dr. M. Kaiser, Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft

Publikationen

Peptidic small molecule activators of stress sensor DegS; P. Hauske, N. Mamant, S. Hasenbein, S. Nickel, C. Ottmann, T. Clausen, M. Ehrmann, M. Kaiser, *Mol. Biosyst.* **(2009)** 5, 980.

Mining the active proteome of *Arabidopsis thaliana*; R.A. van der Hoorn, T. Colby, S. Nickel, K.H. Richau, J. Schmidt, M. Kaiser, *Front. Plant. Sci.* **(2011)**, 2, 89.

A para-nitrophenol phosphonate probe labels distinct serine hydrolases of *Arabidopsis*; S. Nickel, F. Kaschani, T. Colby, R.A. van der Hoorn, M. Kaiser, *Bioorg. Med. Chem.* **(2012)** 20, 601.

Selective inhibition of plant serine hydrolases by agrochemicals revealed by competitive ABPP; F. Kanschani, S. Nickel, B. Panday, B.F. Cravatt, M. Kaiser, R.A. van der Hoorn, *Bioorg. Med. Chem.* (**2012**), 20, 597.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Chemische Synthese des Polyacetylen-Naturstoffes Callysponginsäure und neuartiger, Phosphonat-basierter aktivitätsbasierter Sonden*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Sabrina Nickel* befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden